

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERANTE  
DE XILOPIRANÓSIDOS A TRAVÉS DE SU ACTIVIDAD  
COMO ACEPTORES TRAMPA DE LA ENZIMA  
 $\beta$ -1,4-GALACTOSILTRANSFERASA 7.  
EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA HUMANA  
EN *Escherichia coli*.**

**D. Juan Francisco García García**

Madrid, 2011





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERANTE  
DE XILOPIRANÓSIDOS A TRAVÉS DE SU ACTIVIDAD  
COMO ACEPTORES TRAMPA DE LA ENZIMA  
 $\beta$ -1,4-GALACTOSILTRANSFERASA 7.  
EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA HUMANA  
EN *Escherichia coli*.**

Memoria que para obtener el grado de Doctor por la  
Universidad Autónoma de Madrid presenta  
**D. Juan Francisco García García**

Directores de la Tesis:  
**Dr. Eduardo García-Junceda Redondo**  
**Dr. Alfonso Fernández de Mayoralas Álvarez**  
**Instituto de Química Orgánica General, CSIC**

Tutora de la Tesis:  
**Dra. Isabel Correas Hornero**

Madrid, 2011



El trabajo recogido en esta memoria se ha realizado en el departamento de Química Orgánica Biológica del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de los Drs. Eduardo García-Junceda y Alfonso Fernández-Mayoralas.

El trabajo ha estado financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia y la Comunidad de Madrid dentro de los proyectos:

«Obtención de nuevos biocatalizadores y desarrollo de rutas de síntesis quimioenzimáticas en fase líquida de carbohidratos con potencial utilidad terapéutica» (CTQ2004-03523/BQU).

«Aproximaciones al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos basados en carbohidratos» (CTQ2007-67403/BQU).

«Nuevos procesos catalíticos para la obtención de productos con potencial aplicación terapéutica (CAPOTE)» (S2009/PPQ-1752).

«Catalizadores químicos y enzimáticos de la reacción aldólica. Síntesis de glicósidos antitumorales» (CTQ2010-15418).

Don Juan Francisco García García ha sido financiado por una beca/contrato del programa de Itinerario Integrado de Inserción Profesional (I3P) del Fondo Social Europeo y el CSIC.

Los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

#### **Publicaciones:**

García-García, J. F.; Corrales, G.; Casas, J.; Fernández-Mayoralas, A. y García-Junceda, E. (2011). «Synthesis and evaluation of xylopyranoside derivatives as “decoy acceptors” of human  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 7», *Mol. BioSyst.* **7**, 1312-1321.

## Congresos:

Conferencia: «Heterologous over-expression of human recombinant  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 7 for the study of different xylopyranoside derivatives as “decoy acceptors”».

Julio de 2007: Biotrans 2007, 8th European Conference of Biocatalysis and Biotransformations (Oviedo, España).

Autores: García-García, J. F.; Fernández-Mayoralas, A; García-Junceda, E.

Póster: «Heterologous over-expression of human recombinant  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 7 for the study of different xylopyranoside derivatives as “decoy acceptors”».

Septiembre de 2006: VIII Jornadas de Carbohidratos de La Real Sociedad Española de Química (Alcalá de Henares, España).

Autores: García-García, J. F., Corrales, G., Fernández-Mayoralas, A., García-Junceda, E.

*Fracasé una vez, fracasé diez mil  
y aún así alzo mi copa hacia el cielo.*

*Nacho Vegas, «El hombre que casi conoció a Michi Panero» (2003)*





*A mi familia*

*A Sofía, mi nueva familia*



*El trabajo que contiene esta memoria ha sido realizado en el Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C. bajo la dirección del Dr. Eduardo García-Junceda Redondo, a quien quiero agradecer la oportunidad que me ha brindado para incorporarme a su grupo de investigación y su tutoría a lo largo de los ocho años que estuve en su laboratorio. Además quiero agradecerle la paciencia que ha tenido conmigo en estos últimos años en los que se ha demorado la escritura.*

*Quiero agradecer también al Dr. Alfonso Fernández-Mayoralas su dirección en el trabajo de síntesis orgánica de carbohidratos y el apoyo que ha supuesto en los últimos momentos de la tesis.*

*A la Dra. Isabel Correas le agradezco el haberse prestado a tutelar mi trabajo de investigación.*

*A la Dr. Ágatha Bastida quiero agradecerle especialmente su actuación durante el accidente de trabajo que sufrí en 2007. Ella reaccionó más rápido que yo, y gracias a ello las secuelas no fueron mayores de lo que podrían haber sido.*

*Durante estos ocho años han pasado muchas personas por el laboratorio. Especialmente, me llevo los mejores recuerdos de mis compañeros más directos: Montse, Isra («El Irra») y Laura. Con Fernando vivimos una de las épocas más alegres de mi vida. Nos lo pasamos genial y aprendimos a trabajar codo con codo en un espacio mínimo, sin que hubiese roces o malos rollos. Ojalá todos mis futuros compañeros y compañeras de trabajo fuesen como vosotros. Tampoco me olvidó de Mario y Anita, los dos del labo de al lado (intentar repetir esto cinco veces seguidas), que siempre han estado zascandileando alrededor y gorroneándonos material (sobre todo Mario). Además, la ayuda de Félix, Isa («El Bebé»), Elisa y Lourdes cuando me puse la bata de químico ha sido fundamental. Y si la alegre Kar hubiese estado todavía por allí, estoy convencido de que también me hubiese ayudado en todo lo posible. Ángela, Tania y Esther eran mis chicas favoritas del laboratorio del fondo. Vivimos muy buenos momentos, muchas risas e imborrables recuerdos. Y con Juan Antonio, Isa Oroz, Bea, David, Miguel Ángel, Nacho, Raúl, Dani, Álex los últimos años han sido más llevaderos. Sin vosotros, esta memoria no se habría escrito. No me olvidó tampoco de otros estupendos compañeros que se han dejado caer por el antiguo QOB: Raquel, Eva, Nuria, Conchi, Tati, Pablo, Ainhoa, Rocío, Leyre, Ana, Paco, Igor, Rafa y Samadi. Gracias a todos.*

*Mención especial para Guille. No sólo tiene unas manos extraordinarias para el trabajo de laboratorio, sino que, más importante aún, es su infinita bondad y su calidad humana. Siempre*

dispuesto a dejar lo que sea que estuviese haciendo para ayudar. Lo ha dicho mucha gente antes que yo, pero no por trillado deja de ser verdad: con más personas como tú, este sería sin duda un mundo mejor.

Y ahora toca recordad a todos los amigos que, fuera del laboratorio han estado ahí. Y empiezo por los más antiguos, los más queridos: Carlos, Mar y Javi, lo mejor, a parte de mi familia, que me ha quedado de mi etapa «alcalina». Carlos, casi veinte años y parece que fue ayer cuando salíamos del club de rol por la ventana a comprar refrescos y frutos secos para acompañar las partidas semiclandestinas en la Casa de la Juventud. Nuestra defensa a ultranza, cual paladines de Gondor, de la validez literaria de El Señor de los Anillos (y de lo mala que es, como adaptación, la trilogía de Peter Jackson. Ambos nos quedamos mejor con Brain Dead, ¿no?). Las largas noches de Civilization, con los pobres Concha y Lorenzo preguntándose qué carajo hacíamos encerrados el estudio con el ordenador. Pero lo mejor vino cuando empezamos a salir de la secta, a intercambiar casetes de música y militancia. A ser amigos de verdad, más allá de unos puntos comunes de frikismo. Fueron años intensos en los que empecé a moldearme como ciudadano pensante y como persona. Mar, quince años llevas como la pareja de mi mejor amigo. No se me ocurre nadie mejor; nunca hubo nadie mejor para él. Y ahora llega un retoño y una nueva aventura para los dos. Deseo que os vaya todo de perlas y que pronto nos podáis visitar en nuestro “ranchou”. Javi, no nos hemos visto mucho, apenas unas cuantas veces en los últimos años, pero sé que siempre estarás ahí. Ya me lo demostraste hace cuatro años, cuando el largo tiempo en el que perdimos contacto fue como si no hubiese existido y nos volvimos a juntar como si nada. Ahí estuviste en un momento de ruptura, no se me olvida.

Ana, Rafa, Chus, Fernando (¡segunda mención!), Eva, Mamen, Ángel y Gloria. Mis queridos amigos de la facultad, la mayoría en el mundo de la investigación. Lo recuerdo muy bien. No veíamos otra salida que ésta, y compartíamos la pasión y la excitación al empezar en nuestros respectivos laboratorios. A veces, esa pasión se ha enfriado, la vocación ha cambiado y hemos terminado de forma distinta a como lo veíamos al principio. Pero lo que no se ha enfriado ha sido nuestra amistad. Que nos sigamos viendo desde que terminamos la carrera, hace diez años, y pasando tan buenos momentos es algo digno de destacar.

El mundo de Mordor siempre tendrá un hueco especial en mi corazón. Con ellos he compartido otra pasión, ciega, como es la música. No habrá festival que no hayamos pisado, unos u otros, aunque los mejores han sido en los que hemos estado toda la pandilla. Recuerdo la absoluta felicidad en nuestros rostros tras ver, por fin, a Neil Young en Portugal o a Pearl Jam en Vitoria. Por poner dos ejemplos. Hemos tenido interminables discusiones que a cualquier profano le parecerán un completo horror. Que si es mejor el Sgt. Pepper's Lonely Hearts Club Band o el Their Satanic Majesties Request, que si heavy o punk, que si Nacho Vegas es un cansino o un genio... y me paro que podría

*llenar folios con todos esos momentos. Mientras Mordor suene, seguiremos caminando juntos por el Barrio Canino. Sofi, Montse (¡otra vez!) y Fernando (¡tercera vez! Aunque no quieras reconocerlo, eres un Mordor más), Juan̄kar e Isa (¡y su preciosa Inesildur!), Ana y Alberto, Jimena, Javi y Alfredo, Nacho y Silvia, Agustín («Aguskiss») y Bárber. ¡Os esperamos a todos en el SXSW! ¡Ah, y mención especial para Belén, que ha sido como una nueva hermana!*

*Juanma y Gonzalo. También hay hueco para vosotros dos, briboncetes ¡faltaría más! Los buenos ratos que hemos pasado no los olvidaré nunca. ¿Cuántos viajes hemos hecho al norte sólo para ver a Fermin, eh? Estos últimos años han sido mejores gracias a vosotros, aún incluso con el Vinagrón viviendo en las islas del África occidental. No os olvido, bródel.*

*No me olvido de Arantza, Andoni (sin olvidarme de sus churumbeles ni de sus respectivas familias, un encanto), Idoia y Ricardo, mi familia iruñarra. Hemos compartido mucha, muchísima, fiesta juntos (y muchas, muchísimas, resacas). Siempre me he sentido bienvenido en el norte. Allí dejo un trocito de mí, que se completa con el poquito de todos vosotros que me he llevado en cada viaje. Mila muxuak,*

*Ana fuiste mi compañera mucho tiempo. Vivimos muy felices en Manjatan, nos apoyamos mutuamente en los malos momentos, dándonos fuerzas uno a otro para afrontar los retos que ambos tuvimos, pero desgraciadamente nos terminamos separando. Pasamos, casi sin darnos cuenta, de amigos a pareja, y vivimos muy intensamente. Luego desandamos lo andado y volvimos de pareja a amigos. Y precisamente porque nos llevábamos muy bien, conseguimos terminar sin grandes dramas ni fuertes discusiones. ¡Qué civilizados hemos sido! Muchas gracias por todo lo vivido.*

*A mi familia; mi padre Juan, mi madre Justa, mi hermano Fernando, mis hermanas Olalla (que cambió su tesis en historia por su primera novela y ahí sigue) y Eva y mis cuñados Rafa y Sebas (que es más español de lo que yo lo seré nunca). Y claro, no me olvido de los dos sobrinos preciosísimos y rubísimos: Álvaro y Eva. Aunque soy una persona bastante despegada, en el fondo siempre me ha reconfortado saber que mi familia estaba detrás de mí. Cuando nos miro, a los cuatro hermanos, y veo lo diferentes que somos cada uno ya no me sorprende como antes. Ahora entiendo que ése ha sido el gran mérito de mis padres. Nos han educado tan bien que no se han interpuesto en el camino que cada uno hemos elegido. No digo que todo lo que hayamos hecho o dejado de hacer les haya parecido bien, ni que nos hayan dado carta blanca sin discutir. Pero han sabido ver que el camino que uno anda, debe andarlo solo, por mucho que tropiece.*

*Todo el mundo dice que madre no hay más que una, pero en mi caso se equivocarían de plano. Y es que he tenido la suerte de tener, no una, sino cuatro madres: mis queridas tías Paquita, Evelia y Eulalia, “las Chicas de Oro”, como me gustaba llamarlas, siempre han estado ahí, desde que tengo uso*

*de razón. Los geranios que todos los veranos destrozábamos a base de pelotazos, salpicaduras y trastadas lo atestiguarían gustosos. Lamentablemente, mi tita Eu falleció hace poco, llevaba un tiempo malita la pobre, pero ya descansa en paz. Tampoco me olvido de mi Padrino, D. Francisco de la Flor. Que, como así suena muy solemne, para mí y para mis hermanos era «el Padrino». Y aunque ver a alguien tan alto como él con la boina calada y la sotana de los pies al cuello puede hacer pensar en el oscuro Vito Corleone de Coppola, yo lo recuerdo con la humanidad que el personaje desprende cuando, en la misma película, está charlando con su hijo Michael o jugando despreocupadamente con su nieto. Así era él, y si nuestro armario de juguetes rebosaba de Clics de Famóbil, era cosa suya.*

*En fin, familia, que os quiero a todos. Sin vosotros, esto no habría sido posible.*

*Y el final, como siempre, para lo mejor, para la persona que me ha querido, apoyado y mantenido estos últimos cuatro años. La persona que, simplemente tenerla al lado, tumbada en el sofá en nuestras maratonianas sesiones de cine y vaguismo, ya me reconforta. Sofi, emprendemos una nueva aventura fuera de nuestro país, y hay mejor persona que tú para compartirla. Hay mucha gente en estos agradecimientos, y gracias a todos ellos he conseguido reunir la fuerza para escribir esta memoria. Pero si he terminado esto, ha sido por ti, guapita. Cuando flaqueaba, sólo tenía que pensar «hazlo por ella». Y cuando tu contagiosa, preciosa sonrisa aparecía en mi cabeza, mis dedos comenzaban a teclear sin pensar. Téailoviu, petisa.*

## Índice

Índice .....	I
Relación de abreviaturas utilizadas en la presente memoria .....	V
<b>Capítulo 1: resumen del trabajo (en inglés).....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2: Introducción.....</b>	<b>5</b>
<i>Importancia biológica de los proteoglicanos.....</i>	<i>7</i>
<i>Primera parte: visión general de la estructura y metabolismo de los PG .....</i>	<i>8</i>
Estructura y función de los PG .....	8
<i>Los PG de membrana y sus proteínas núcleo .....</i>	<i>9</i>
<i>Los PG de la MEC y sus proteínas núcleo.....</i>	<i>12</i>
Proteoglicanos intersticiales .....	14
Proteoglicanos de la membrana basal .....	15
<i>Los PG de los gránulos de secreción.....</i>	<i>16</i>
<i>Glicosaminoglicanos, los «brazos» de los proteoglicanos .....</i>	<i>16</i>
Las modificaciones en los monosacáridos de los GAG son vitales para la unión entre los PG y las moléculas diana.....	19
La unión entre la proteína núcleo y los GAG se da a través de un tetrasacárido conector unido a serina .....	21
Biosíntesis de proteoglicanos .....	23
<i>Formación del tetrasacárido conector.....</i>	<i>23</i>
Los $\beta$ -D-xilopiranosidos pueden iniciar artificialmente la biosíntesis de GAG: los xilopiranosidos como «aceptores trampa» de la enzima B4GALT7.....	26
<i>Polimerización del glicosaminoglicano.....</i>	<i>26</i>
Iniciación de las cadenas de HS y C/DS .....	29
Polimerización de las cadenas de CS .....	30
Polimerización de los HS.....	30

<i>Maduración de los GAG: modificaciones del esqueleto de los monosacáridos .....</i>	<i>31</i>
Modificación de las cadenas de CS y DS .....	32
Modificación de las cadenas de HS .....	32
Las modificaciones en el tetrasacárido conector .....	35
¿Cómo discrimina la célula entre C/DS y HS? .....	35
La proteína núcleo contiene secuencias que determinan la formación de HS o CS ...	36
Las modificaciones del tetrasacárido conector .....	38
Metabolismo y degradación de los proteoglicanos.....	39
<b>Segunda parte: los <math>\beta</math>-D-xilopiranosidos pueden inhibir el crecimiento celular: xilopiranosidos como anticancerígenos .....</b>	<b>43</b>
<b>Capítulo 3: objetivos .....</b>	<b>47</b>
<b>Capítulo 4: materiales y métodos .....</b>	<b>51</b>
<b><i>Primera Parte: obtención y caracterización de la enzima <math>\beta</math>-1,4-galactosiltransferasa 7 humana .....</i></b>	<b><i>53</i></b>
Materiales.....	53
Metodologías generales.....	55
Subclonación del gen B4GALT7 en el vector pET 28-b(+).....	56
Sobreexpresión y purificación de B4GALT7 .....	57
Sobreexpresión de B4GALT7.....	57
Purificación de B4GALT7 .....	58
Caracterización bioquímica de B4GALT7 .....	58
Análisis por HPLC de la actividad galactosiltransferasa .....	58
Análisis espectrofotométrico de la actividad galactosiltransferasa.....	59
Cálculo de las constantes cinéticas para p-Nph- $\beta$ -D-xyl y UDP-Gal .....	59
Estudios de cofactores enzimáticos .....	60
Estudios de pH óptimo .....	60
Estudios de especificidad de sustrato .....	61
Estudio de diferentes xilopiranosidos como «aceptores trampa» .....	61
Cálculo de las constantes cinéticas para los xilopiranosidos .....	61
Ensayos de $IC_{50}$ .....	61
Cálculo de la $k_i$ del 2-(6-hidroxinaftil) $\beta$ -D-xilopiranosido frente a p-nitrofenil $\beta$ -D-xilopiranosido .....	62



Ensayos de los xilopiranosidos como agentes antiproliferantes.....	62
<b>Segunda parte: síntesis de xilopiranosidos con aglicones hidrófobos</b>	<b>63</b>
Procedimientos generales .....	63
Síntesis de xilopiranosidos con grupos amido en el aglicón.....	65
<i>Preparación del 1,2,3,4-tetra-O-acetil <math>\beta</math>-D-xilopiranosida (2)</i> .....	65
<i>Preparación del 2-cianoetil 2,3,4-tri-O-acetil <math>\beta</math>-D-xilopiranosido (3)</i> .....	65
<i>Preparación de 3-acetamido-propil <math>\beta</math>-D-xilopiranosido (9)</i> .....	66
<i>Preparación de 3-hexanamido-propil <math>\beta</math>-D-xilopiranosido (10)</i> .....	67
<i>Preparación de N-[O-(<math>\beta</math>-D-xilopiranosil)-3-hidroxipropil]-succinamato de sodio (11)</i> .....	68
<i>Preparación de 3-benzamido-propil <math>\beta</math>-D-xilopiranosido (12)</i> .....	69
<i>Preparación de N-[O-(<math>\beta</math>-D-xilopiranosil)-3-hidroxipropil]-ftalamato de sodio (13)</i> .....	70
Preparación de O <sub>Y</sub> -xilopiranosil-L-serina.....	71
<i>Preparación de O<sub>Y</sub>-(2,3,4-tri-O-acetil <math>\beta</math>-D-xilopiranosil)-N-Cbz-L-serina-metil éster (15)</i> .....	71
<i>Preparación de O<sub>Y</sub>-<math>\beta</math>-D-xilopiranosil-N-Cbz-L-serina-metil éster (16)</i> .....	72
Síntesis de 2-(6-hidroxi-naftil) $\beta$ -D-xilopiranosido (18) .....	73
<b>Capítulo 5: resultados</b> .....	<b>75</b>
<b><i>Primera parte: expresión heteróloga de una versión truncada de la proteína humana <math>\beta</math>-1,4-galactosil-transferasa 7 (B4GALT7) y su caracterización bioquímica</i></b> .....	<b>77</b>
Clonación.....	78
Sobreexpresión y purificación.....	84
Caracterización bioquímica de la enzima B4GALT7 .....	87
<i>Medida de los parámetros cinéticos para p-Nph-<math>\beta</math>-D-xyl (1) y UDP-Gal</i> .....	90
<i>Estudios de especificidad de sustrato</i> .....	93
<i>Estudio del efecto de diferentes cationes divalentes en la actividad de la enzima B4GALT7 recombinante</i> .....	94
<i>Estudios para el cálculo del pH óptimo</i> .....	96
<b><i>Segunda parte: síntesis de diferentes xilopiranosidos</i></b> .....	<b>97</b>
Síntesis de xilopiranosidos con grupo amido en el aglicón .....	97

Síntesis de xilopiranosil-serina.....	99
Síntesis del 2-(6-hidroxinaftil) $\beta$ -D-xilopiranosido (18).....	100
<b><i>Tercera parte: actividad biológica de los xilopiranosidos como sustratos y aceptores trampa de B4GALT7 y actividad antiproliferante frente a cultivos celulares</i></b> .....	<b>101</b>
Estudio de xilopiranosidos como aceptores .....	102
<i>Medida de los parámetros cinéticos</i> .....	104
Pruebas como aceptores trampa .....	105
<i>Caracterización de la inhibición de B4GALT7 producida por los «aceptores trampa»: cálculo de la <math>k_i</math> de 2-(6-hidroxinaftil) <math>\beta</math>-D-xilopiranosido frente a p-nitrofenil <math>\beta</math>-D-xilopiranosido</i> .....	110
Pruebas como agentes antiproliferantes.....	112
<b>Capítulo 6: discusión de resultados</b> .....	<b>117</b>
Desarrollo del sistema de expresión .....	119
Xilopiranosidos como sustratos, aceptores trampa y antiproliferantes .....	123
<b>Conclusiones</b> .....	<b>129</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>133</b>
<b>Anexo (Mol. BioSyst. 7: 1312-1321)</b> .....	<b>173</b>

Relación de abreviaturas utilizadas en la presente memoria:<sup>[1]</sup>

<b>2/4/6-O-S</b>	2/4/6-O-sulfatación
<b>A. E.</b>	Análisis elemental
<b>aá(s)</b>	Aminoácido(s)
<b>AcCoA</b>	Acetil coenzima A
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ADN/DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>anMan</b>	Anhidromanosa
<b>B4GALT(1-7)</b>	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (1-7)
<b>CFE</b>	Extracto libre de células ( <u>C</u> ell <u>F</u> ree <u>E</u> xtract)
<b>ChSy</b>	Condroitina sintasa
<b>ChPF</b>	Factor de polimerización de condroitina
<b>CS</b>	Condroitina sulfato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DS</b>	Dermatano sulfato
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico ( <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> uerum)
<b>Fuc</b>	Fucosa
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>GalNAc</b>	N-acetil galactosamina
<b>Glc</b>	Glucosa

---

<sup>[1]</sup> Para las abreviaturas concretas utilizadas para cada enzima de las rutas metabólicas de los PG, consultar la **Tabla 5**, la **Tabla 6**, la **Tabla 7**, la **Tabla 8** y la **Tabla 10**.

<b>GlcA</b>	Ácido glucurónico
<b>GlcN</b>	Glucosamina
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetil glucosamina
<b>GlcNS</b>	Glucosamina <i>N</i> -sulfato
<b>GT</b>	Glicosiltransferasa
<b>Hex</b>	Hexano
<b>HS</b>	Heparano sulfato
<b>HS-POL</b>	Heparano sulfato polimerasa
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i><u>H</u>igh <u>P</u>erformance <u>L</u>iquid <u>C</u>hromatography</i> )
<b>IMAC</b>	Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados ( <i><u>I</u>mmobilized <u>M</u>etal <u>A</u>ffinity <u>C</u>hromatography</i> )
<b>IdoA</b>	Ácido idurónico
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-tio-galactopiranosido
<b>KS</b>	Queratano sulfato
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>Man</b>	Manosa
<b>MEC</b>	<u>M</u> atriz <u>e</u> xtrac <u>e</u> lular (o <u>m</u> edio <u>e</u> xtrac <u>e</u> lular)
<b>MBP</b>	Proteína de unión a maltosa ( <i><u>M</u>altose <u>B</u>inding <u>P</u>rotein</i> )
<b>MPS</b>	<u>M</u> ucopolisacaridosis
<b>MU</b>	metil-umbeliferil
<b>NDST</b>	<i>N</i> -desacetilasa/ <i>N</i> -sulfotransferasa
<b>Nph</b>	nitrofenilo
<b>NeuAc</b>	Ácido <i>N</i> -acetil-neuranímico
<b>O/N</b>	Toda la noche ( <i><u>o</u>ver<u>n</u>ight</i> )

<b>t. a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TFA</b>	Ácido trifluoro acético
<b>PAPS</b>	3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato
<b>PG</b>	Proteoglicano
<b>PG(H/C/D/K)S</b>	Proteoglicano de (heparano/condroitina/dermatano/keratano) sulfato
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>ST</b>	Sulfotransferasa
<b>UDP-Gal</b>	Uridín difosfo- $\alpha$ -D-galactopiranosido (UDP-galactosa)
<b>wt</b>	fenotipo silvestre (de <i>wild type</i> )
<b>Xyl</b>	Xilosa



## **Capítulo 1: resumen del trabajo (en inglés)**





Proteoglycans (PGs), including heparan sulfate (HS) forms, are important regulators of tumor progression. In the PGs biosynthetic process, the core protein is synthesized on a ribosomal template and the sugar chains are assembled post-translationally, one sugar at a time, starting with the linkage of xylose to a serine residue of the core protein and followed by galactosylation of the xylosylprotein (Esko *et al.*, 2009). This step is catalyzed by the xylosylprotein  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 7 (B4GALT7) (Almeida *et al.*, 1999; Okajima *et al.*, 1999a).

Hydrophobic xylopyranosides have been previously shown to prime glycosaminoglycan (GAG) synthesis, including GAG-HS forms, acting as a “decoy acceptors” of the B4GALT7 (Kolset *et al.*, 1990). The compound 2-(6-hydroxynaphthyl)  $\beta$ -D-xylopyranoside was shown to cause growth inhibition of tumor cells, acting as a potent antiproliferative and anticarcinogen compound. This property was related to this ability to prime the HS synthesis (Mani *et al.*, 1998; 2004). So, the ability of the xylosides to prime the assembly of HS chains—and hence their potential activity as antitumor agents—must be related to their ability to act as acceptors of B4GALT7.

To know if the antiproliferative activity of synthetic xylopyranosides is related to their ability to act as “decoy acceptors” of B4GALT7, we have first heterologously expressed the catalytic domain of the human protein in *Escherichia coli* in a soluble

and stable form as a fusion protein with a polihistidine tag. The recombinant protein was purified through homogeneity and kinetically characterized.

After that we have studied the ability of a variety of synthetic xylopyranoside derivatives to act as substrates or inhibitors of the recombinant enzyme.

The xylopiranosides were synthesized as 3-amidopropyl derivatives, containing a common *N*-(*O*-xylopyranosyl)-hydroxylpropylamide moiety with a variable group that was selected to compare the effect of their different functional groups on the activity of the xyloside as decoy acceptor. The kinetic parameters for each single compound was obtained, showing a range of catalytic efficiencies that could be related to the structure of their aglycon moieties. Only the xylopyranosides with a voluminous aglycon groups show activity as decoy acceptors.

To test if there is a relationship between the catalytic efficiency of the recombinant B4GALT7 with the different xylopyranosides and their antiproliferative activity, we assayed selected xylosides against the human lung carcinoma cell line A549. A representative sample of different xylosides was chosen attending to both their activities as decoy acceptors and their unique structural features. As expected, the xylosides that could not act as acceptor of B4GALT7 shows a lack of antiproliferative activity. The rest of xylopyranosides tested showed  $IC_{50}$  values lower than the reference compound 2-(6-hydroxynaphthyl)  $\beta$ -D-xylopyranoside. A weak correlation between the activity as acceptors of B4GALT7 and activity as antiproliferatives of the xylopyranoside compounds was found.

In conclusion, we have shown that it is possible to heterologously express the catalytic domain of the human B4GALT7, soluble and stable enough to undertake *in vitro* studies with it. This achievement opens the possibility of developing an easy-to-use method to test the activity as decoy acceptors of natural and synthetic xylopyranosides. Since priming the synthesis of GAG is required but not enough for the antiproliferative activity of the xylosides, it is not possible to establish a direct strong correlation between the kinetic parameters of the recombinant B4GALT7 and the antiproliferative activity of the different xylopyranosides tested. On the other hand, preliminary results obtained in A549 cell line suggest that some xylopyranosides exhibit a promising antiproliferative activity.

## **Capítulo 2: Introducción**



## Importancia biológica de los proteoglicanos

Los proteoglicanos (PG) son estructuras biológicas complejas e indispensables para mediar los procesos de comunicación de la célula con el medio en el que ésta se encuentra inmersa (para revisiones, *cf.* Kjellén y Lindahl, 1991; Yanagishita y Hascall, 1992; Esko y Selleck, 2002; Whitelock e Iozzo, 2005; Esko *et al.*, 2009; Varki y Lowe, 2009) y son exclusivos de células animales, por tanto, ausentes en plantas, hongos y protozoos (Wilson, 2004).

Entre los procesos celulares en los que median los PG, nos encontramos con algunos tan importantes como la comunicación célula-célula (Ruoslahti, 1989), la especialización, diferenciación y desarrollo celulares (para una revisión del papel de los PG en el desarrollo, *cf.* Häcker *et al.*, 2005), la embriogénesis (French *et al.*, 1999) y un largo etcétera. A nivel tisular, los proteoglicanos son esenciales para el correcto mantenimiento de la estructura, porosidad e integridad de los tejidos (Varki y Lowe, 2009).

Existen múltiples sustancias que pueden interaccionar con los PG, entre las que se encuentran citoquinas (Koopmann *et al.*, 1999), selectinas (Norgard-Sumnicht y

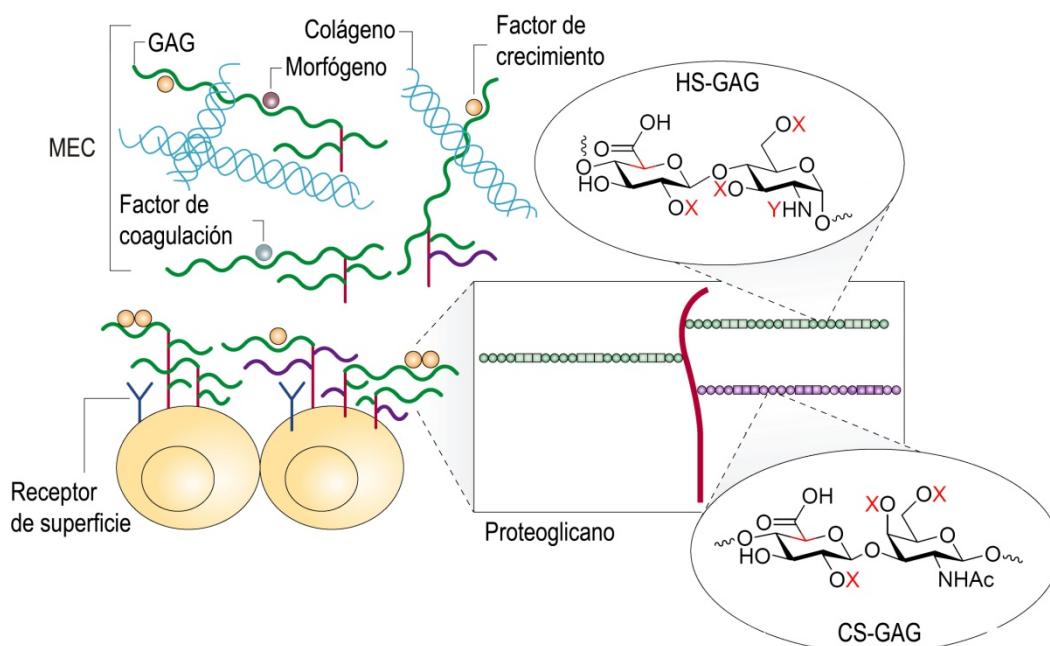
Varki, 1995), factores de crecimiento (Ruoslahti y Yamaguchi, 1991) y de coagulación (Liu y Pedersen, 2007) y, en general, proteínas de todo tipo (Rosenberg *et al.*, 1997; Raman *et al.*, 2005). Además, los PG pueden estar implicados en el almacenamiento, eliminación y secreción de algunas de estas sustancias con las que interaccionan, como, por ejemplo, el factor plaquetario 4 (Périn *et al.*, 1988).

Como consecuencia de su actividad biológica, los PG se encuentran involucrados en el desarrollo de procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer (Watanabe *et al.*, 2004), la osteoartritis (Plaas *et al.*, 1998) y la arteriosclerosis (para una revisión *cf.* Little *et al.*, 2008), en las interacciones entre virus y células que posibilitan el proceso infeccioso (por ejemplo, la entrada del virus del herpes simple en las células hospedadoras; Shukla y Spear, 2001) o en procesos relacionados con el cáncer, como son la tumorigénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis (para una revisión sobre la implicación de los PG en el cáncer *cf.* Sasisekharan *et al.*, 2002). Estos procesos pueden ser el resultado de un mal funcionamiento del metabolismo de los PG o pueden deberse al oportunismo de agentes patógenos que hayan desarrollado estructuras miméticas que les sirvan de ayuda en el desarrollo de la enfermedad (Varki y Lowe, 2009). Por todo ello, los PG se encuentran entre las dianas de la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos fármacos y agentes bioactivos (Coombe y Kett, 2005; de Kort *et al.*, 2005; Sakai *et al.*, 2006).

## **Primera parte: visión general de la estructura y metabolismo de los PG**

### ***Estructura y función de los PG***

Los proteoglicanos están formados por la unión covalente de una proteína denominada **proteína núcleo** y un heteropolisacárido no ramificado denominado **glicosaminoglicano** (GAG). Este último está formado a su vez por la repetición de un disacárido unidad (**Figura 1**). Todas las células de mamíferos y animales superiores



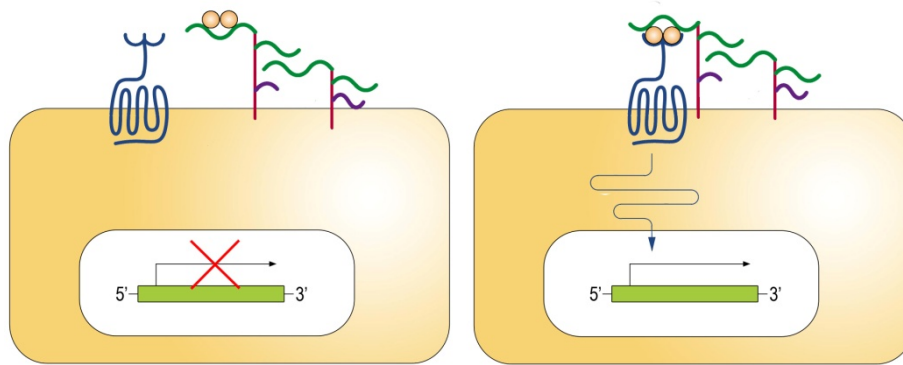
**Figura 1.** Los proteoglicanos (PG) están formados por la unión de una proteína núcleo y cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), pudiendo estar libres en la matriz extracelular (MEC) o anclados a la superficie celular. Las proteínas son específicas de cada tipo celular y su expresión está relacionada con las respuestas fisiológicas al MEC (Häcker *et al.*, 2005). Los GAG interaccionan con un gran número de agentes biológicos, ayudando así a organizar la MEC, y están formados por la repetición de un disacárido. La heparina y los heparanos sulfato (en verde) están formados por la repetición del disacárido GlcA- $\beta$ 1,4-GlcNAc- $\alpha$ 1,4-, mientras que las condroitinas y dermatanos sulfato (en morado) están constituidas por repeticiones de GlcA- $\beta$ 1,3-GalNAc- $\beta$ 1,4-. En ambos casos, los monosacáridos pueden estar modificados en algunos residuos (indicados en rojo), donde X = H, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Y = AcO<sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El C-5 del residuo de GlcA puede epimerizar a IdoA. Modificación de una figura de Sasisekharan *et al.* (2002). Sobre todo ello se profundizará más adelante.

son capaces de producir PG,<sup>[2]</sup> que funcionan a tres niveles: excretados a la matriz extracelular (MEC), anclados en las membranas celulares o acumulados en gránulos para su posterior secreción al medio.

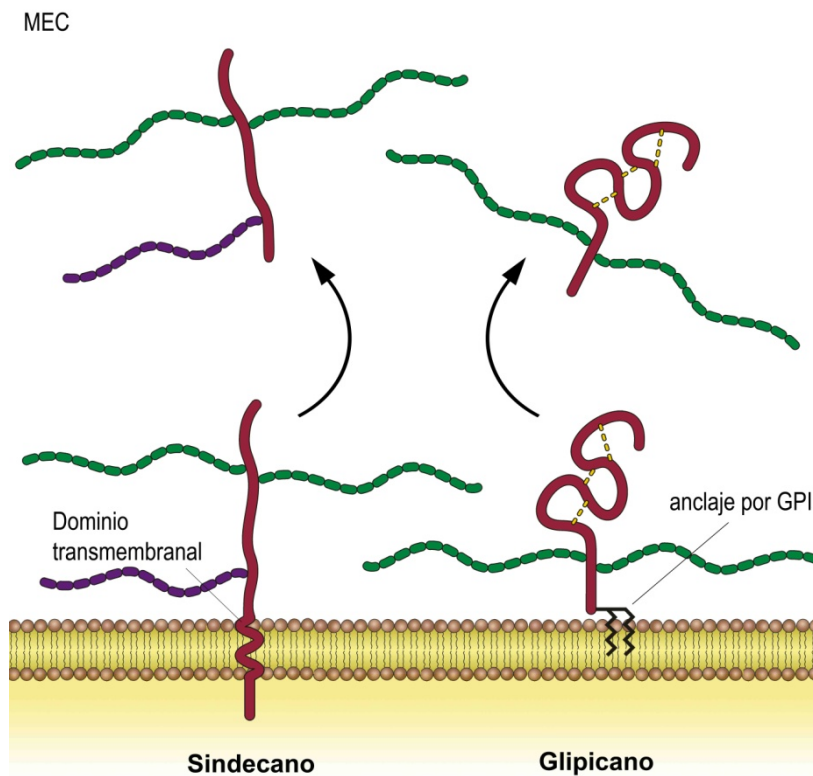
## Los PG de membrana y sus proteínas núcleo

Los PG de membrana interaccionan con moléculas específicas de la MEC y actúan como receptores de ligandos que disparan determinados procesos celulares.

<sup>[2]</sup> Tanto los invertebrados como los vertebrados producen los mismos tipos de PG, aunque con ligeras diferencias en su estructura. Cf. Esko *et al.*, 2009.



**Figura 2.** Los PG pueden actuar como correceptores en algunas cascadas de transducción de señales. Los PG se unen a los morfógenos (Wnt, Hh o TGF- $\beta$ , entre otros) y facilitan la interacción de éstos con sus receptores.



**Figura 3.** Estructura de los proteoglicanos de membrana. Las proteínas núcleo de los sindecanos tienen un topología transmembranal de tipo I, esto es, con un dominio hidrófobo que atraviesa la membrana celular y un tallo citoplasmático en el C-t. El dominio N-t se encuentra expuesto hacia el exterior celular. Los glipicanos se anclan a la membrana mediante GPI en el extremo C-t. Las Cys conservadas a lo largo de su secuencia forman puentes disulfuro (representados como rayas discontinuas amarillas), lo que le confiere a la proteína núcleo su característica forma globular. En ambos casos, existen sitios de corte, bien por proteasas, bien por fosfolipasa C, que permiten liberar los PG al MEC.



Pueden, por ejemplo, regular la eliminación de determinados ligandos del MEC (Fuki *et al.*, 1997; Poon y Gariépy, 2007), participar en los procesos de transducción de señales, actuando como correceptores para varios factores de crecimiento (**Figura 2**) (Miao *et al.*, 1995) y cooperar con integrinas y otros receptores regulando la movilidad de las células (Carey *et al.*, 1990).

**Tabla 1.** Proteoglicanos de membrana: familia de los sindecanos, familia de los glipicanos y otros.

Proteína núcleo	Gen <sup>[a]</sup>	Localización <sup>[b]</sup>	Referencia
Sindecano (Sindecano 1)	<i>SDC1</i> (AJ551176)	Hígado, pulmón, riñón y piel	Mali <i>et al.</i> , 1990
Fibroglicano (Sindecano 2)	<i>SDC2</i> (BC030133)	Hígado, riñón, cerebro, músculo	Marynen <i>et al.</i> , 1989
N-Sindecano (Sindecano 3)	<i>SDC3</i> (AF248634)	Cerebro, corazón, sistema nervioso en desarrollo	Berndt <i>et al.</i> , 2001
Riudocano o amfiglicano (Sindecano 4)	<i>SDC4</i> (X67016)	Hígado, riñón, pulmón, cerebro	David <i>et al.</i> , 1992; Kojima <i>et al.</i> , 1992
Glipicano 1	<i>GPC1</i> (AK095397)	Cerebro, riñón, pericondrio	David <i>et al.</i> , 1990
Cerebroglipicano (Glipicano 2)	<i>GPC2</i> (BX375153)	Sistema nervioso	Stipp <i>et al.</i> , 1994 <sup>[c]</sup>
Glipicano 3	<i>GPC3</i> (L47125)	Intestino, mesodermo	Lage y Dietel, 1997
K-glipicano (Glipicano 4)	<i>GPC4</i> (AF030186)	Vasos sanguíneos, riñón, cerebro	Watanabe <i>et al.</i> 1995
Glipicano 5	<i>GPC5</i> (AF001462)	Cerebro, riñón, limbo, testículos	Veugelers <i>et al.</i> , 1997
Glipicano 6	<i>GPC6</i> (AF111178)	Músculo, riñón, pulmón, dientes, gónadas	Veugelers <i>et al.</i> , 1999; Paine-Saunders <i>et al.</i> , 1999
NG2	<i>CSPG4</i> (AY359468)	Piel	Pluschke <i>et al.</i> , 1996
CD44	<i>CD44</i> (NM_000610)	Epitelio, piel	Dougherty <i>et al.</i> , 1991
Fosfacano	<i>PTPRZ1</i> (AK294062)	SNC, cerebro	Levy <i>et al.</i> , 1993

<sup>[a]</sup> Se indica el nombre oficial del gen humano y el número de acceso al GenBank™ (entre paréntesis).

<sup>[b]</sup> Los niveles de expresión de los sindecanos cambian durante el desarrollo y diferenciación celulares, reflejo del papel clave que juegan en estos procesos (Kim *et al.*, 1994). Los glipicanos se expresan generalmente durante el desarrollo. Los niveles de expresión y localización cambian de forma específica entre los distintos tipos celulares y los diferentes estadios del desarrollo, lo que es un indicador del importante papel que juegan en la morfogénesis (Filmus y Selleck, 2001).

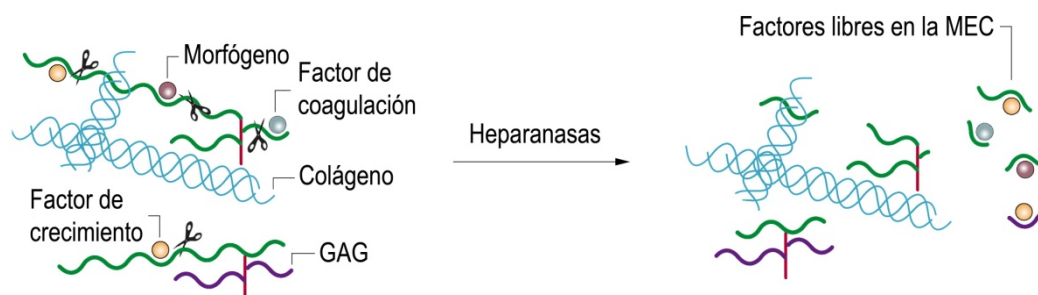
<sup>[c]</sup> Esta referencia corresponde a la clonación de la proteína de rata. El ortólogo humano no se encuentra clonado.

Existen varios tipos de PG anclados a las membranas celulares, como NG2 (Lin *et al.*, 1996), la glicoproteína CD44 (Schmitz *et al.*, 1995) o el fosfacano (Maurel *et al.*, 1994), pero los más importantes son las familias de los sindecanos y los glipicanos (Figura 3).

Las proteínas que forman los sindecanos tienen una topología transmembranal de tipo I (Mali *et al.*, 1990) y se conocen cuatro tipos diferentes en mamíferos (**Tabla 1**). Los glipicanos están formados por proteínas de membrana ancladas a través de un grupo de glicofosfatidil inositol (GPI) y existen seis clases conocidas en mamíferos (**Tabla 1**). Ambas familias presentan poca homología de secuencia entre sus miembros (Yanagishita y Hascall, 1992; Esko *et al.*, 2009; Fransson *et al.*, 2000; Filmus y Selleck, 2001).

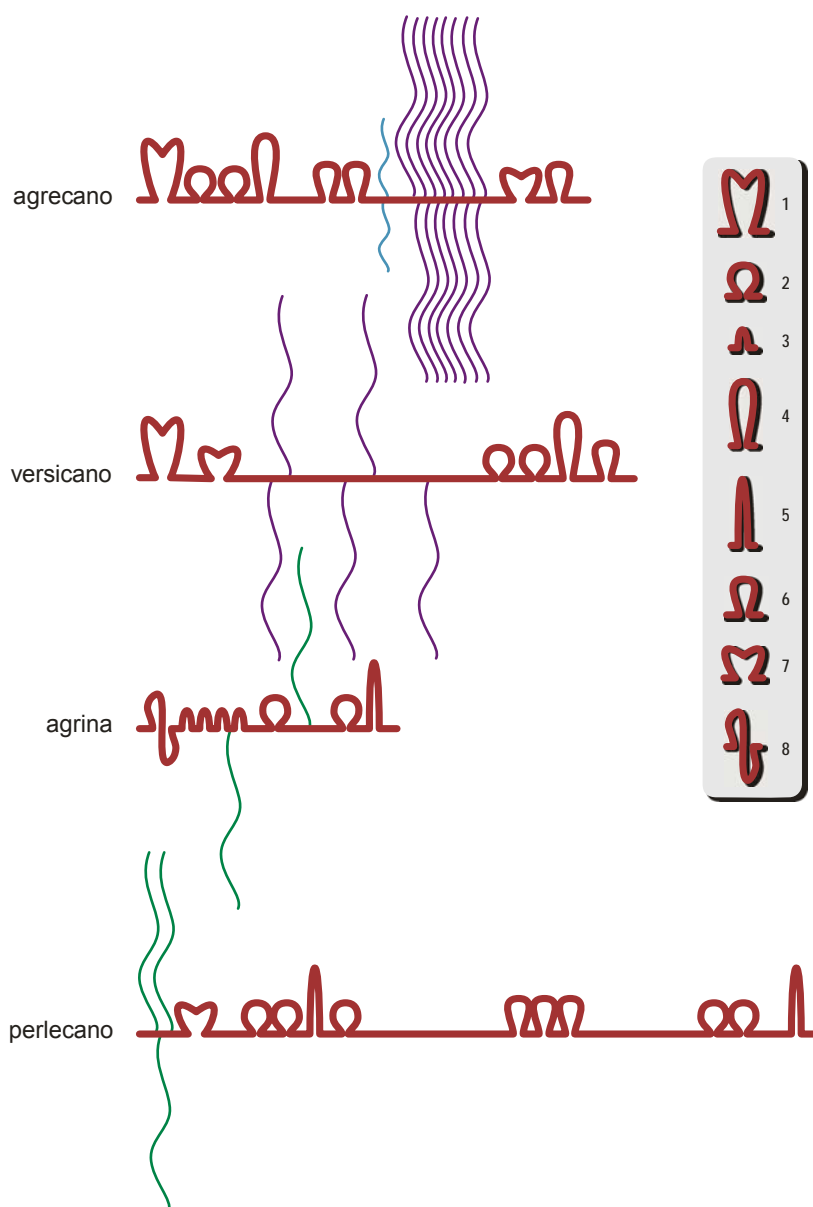
### Los PG de la MEC y sus proteínas núcleo

El componente principal de la MEC son proteínas fibrosas (como el colágeno o la elastina) y de adhesión (como la fibronectina o la laminina). Los proteoglicanos presentes en la MEC interaccionan con ellas (Koda *et al.*, 1985; Saunders y Bernfield, 1988; Ruoslahti, 1989), proporcionando al tejido las características necesarias de resistencia, elasticidad, etc. Además, pueden unir citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y morfógenos, formando así un fondo de moléculas reguladoras que pueden ser liberadas mediante la degradación selectiva de la matriz (Saksela y Rifkin, 1990; Bame, 2001). Así, protegen a estos compuestos de la degradación y facilitan la formación de los gradientes necesarios para la especialización celular y el desarrollo (**Figura 4**) (Ruoslahti y Yamauchi, 1991).



**Figura 4.** Los PG de la MEC interaccionan con proteínas como el colágeno, diferentes compuestos bioactivos como factores de crecimiento, citoquinas, etc. La acción específica de las heparanasas (representadas con unas tijeras) liberan de manera selectiva estos factores de la MEC.

Existen dos grandes tipos de PG que forman la MEC. Los PG intersticiales, que forman parte del tejido conjuntivo, y los PG de la membrana basal. Ambos tipos de PG están formados por proteínas núcleo de estructura modular, esto es, están formadas por la unión de diferentes dominios estructurales (**Figura 5**).



**Figura 5.** PG de la matriz extracelular: PG intersticiales y de la membrana basal. Ambos se sintetizan en el interior celular y se excretan directamente al medio, siendo muy importantes para su estabilización. Las proteínas núcleo (en rojo) están formadas por módulos con diferentes dominios de plegamiento por los que pueden interaccionar con carbohidratos y proteínas de la MEC (1, dominios de unión a proteínas; 2 EGF; 3, folistatina; 4, lectina; 5, laminina G; 6, inmunoglobulina; 7, módulos de unión —*protein link modules*—; 8, unión a laminina). Las cadenas de GAG pueden ser de heparanos sulfato (en verde), condroitinas sulfato (morado) y/o keratanos sulfato (azul).

### Proteoglicanos intersticiales

Las dos familias que forman los PG intersticiales son los lecticanos (o la familia del agrecano) y los proteoglicanos ricos en leucina o SLRPG<sup>[3]</sup> (**Tabla 2**). Los primeros, que incluyen al agrecano, al versicano, al brevicano y al neurocano son de estructura modular y están formados por dominios de plegamiento unidos alrededor de un dominio central de unión a GAG (Zimmerman y Ruoslahti, 1989). Los SLRPG,

**Tabla 2.** Proteoglicanos intersticiales: las familias del agrecano y de los SLRPG.

Familia	Proteína	Gen <sup>[a]</sup>	Localización	Referencia	
Agrecano	Agrecano	ACAN (M55172)	Cartílago	Doege <i>et al.</i> , 1991	
	Versicano	VCAN (X15998)	Cerebro y plasma	Krusius <i>et al.</i> , 1987	
	Brevicano	BCAN (BC027971)	Cerebro	Gary <i>et al.</i> , 2000	
	Neurocano	NCAN (AF026547)	Cerebro	Prange <i>et al.</i> , 1998	
SLRPG	Clase I <sup>[b]</sup>	Decorina	DCN (AF138300)	Ubicuo, cerebro, piel, hueso	Krusius y Ruosahti, 1986
		Biglicano	BGN (AK092954)	Ubicuo, hueso, vasos sanguíneos	Fisher <i>et al.</i> , 1989
	Clase II <sup>[b]</sup>	Fibromodulina	FMOD (U05291)	Ubicuo: córnea, tendón, piel, cartílago	Antonson <i>et al.</i> , 1993
		Lumicano	LUM (BT006707)	Córnea, músculo, piel, intestino, ligamentos,	Chakravarti <i>et al.</i> , 1995 Grover <i>et al.</i> , 1995
		Queratocano	KERA (AF063301)	Córnea, tráquea	Tasheva <i>et al.</i> , 1999
		PRELP	PRELP (BC032498)	Cartílago	Bengtsson <i>et al.</i> , 1995
		Osteomodulina	OMD (AB000114)	Hueso	Sommarin <i>et al.</i> , 1998
	Clase III <sup>[b]</sup>	Mimecano	OGN (AI424992)	Hueso	Madisen <i>et al.</i> , 1990
		Epificano	EPYC (AF031658)	Cartílago, ligamentos, placenta	Deere <i>et al.</i> , 1996

<sup>[a]</sup> Se indica el nombre oficial del gen humano y su número de acceso al GenBank<sup>TM</sup> (entre paréntesis).

<sup>[b]</sup> Los SLRPGs se clasifican en tres tipos, dependiendo de varios factores como el número de repeticiones de las secuencias ricas en leucina, la organización genética y sus convergencias evolutivas. Los SLRPGs de clase I y II tienen 10 repeticiones de secuencias ricas en leucina, mientras que los de clase III tienen siete repeticiones (Iozzo, 1999).

<sup>[3]</sup> De Small Leucine-Rich Proteoglycans, en inglés.

son una familia de nueve miembros que se caracterizan por la repetición de secuencias ricas en leucina, que constituyen la práctica totalidad de la cadena de aminoácidos (Iozzo, 1999).

### ***Proteoglicanos de la membrana basal***

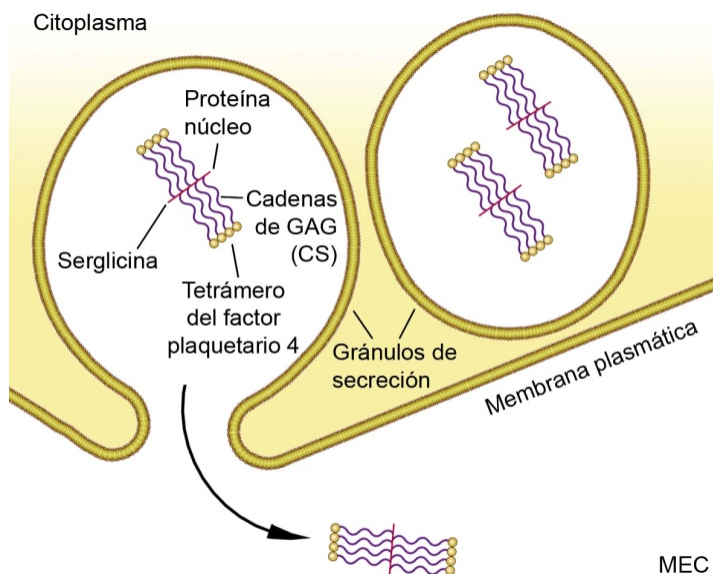
La membrana basal es una fina capa de material cartilaginoso que recubre el endotelio (los vasos sanguíneos) y el epitelio (la superficie de órganos y tejidos). Actúa como un filtro y ayuda a la compartimentación tisular, regulando así la diferenciación y organización celulares. Estos procesos están controlados, en gran parte, por los PG que la forman, que interaccionan con un gran número de sustancias en la MEC (Groffen *et al.*, 1998; Farach-Carson y Carson, 2007), además de ser vitales para el mantenimiento de la estructura de la membrana (Sertié *et al.*, 2000). Los PG más importantes que forman parte de la membrana basal son el colágeno XII y XVII, el perlecano, la agrina y el leprecano (**Tabla 3**), algunos con marcadas propiedades antitumorales (O'Reilly *et al.*, 1997; Farach-Carson y Carson, 2007).

**Tabla 3.** Proteoglicanos de la membrana basal.

<b>Proteoglicano</b>	<b>Gen<sup>[a]</sup></b>	<b>Localización<sup>[b]</sup></b>	<b>Referencia</b>
Perlecano	<i>HSPG2</i> (M85289)	Ubicuo: cartílago, hueso, decidua uterina, placenta	Kallunki y Tryggvason, 1992; Murdoch <i>et al.</i> , 1992
Agrina	<i>AGRN</i> (XM_372195)	Ubicuo: riñón, pulmón, hígado	Groffen <i>et al.</i> , 1998
Leprecano	<i>LEPRE1</i> (AK027648)	SNC, testículos, ovario, placenta	Kaul <i>et al.</i> , 2000
Colágeno XII	<i>COL12A1</i> (U73779)	Músculo esquelético, riñón, intestino delgado, córnea, endotelio, pulmón, placenta	Oh <i>et al.</i> , 1992
Colágeno XVIII	<i>COL18A1</i> (NM_030582)	Corazón, riñón, pulmón, retina, epidermis, vasos sanguíneos	Oh <i>et al.</i> , 1994

<sup>[a]</sup> Se indica el nombre oficial del gen humano y su número de acceso al GenBank™ (entre paréntesis).

<sup>[b]</sup> Debido a la implicación de los PG de la membrana basal en la morfogénesis, desarrollo y diferenciación de las células, sus patrones de expresión pueden variar dramáticamente en los diferentes estadios del tejido o la célula (Farach-Carson y Carson, 2007)



**Figura 6.** La serglycina, uno de los PG de los gránulos de secreción mejor conocidos, es capaz de unir el factor plaquetario 4, participando así en su almacenaje y secreción al medio.

### Los PG de los gránulos de secreción

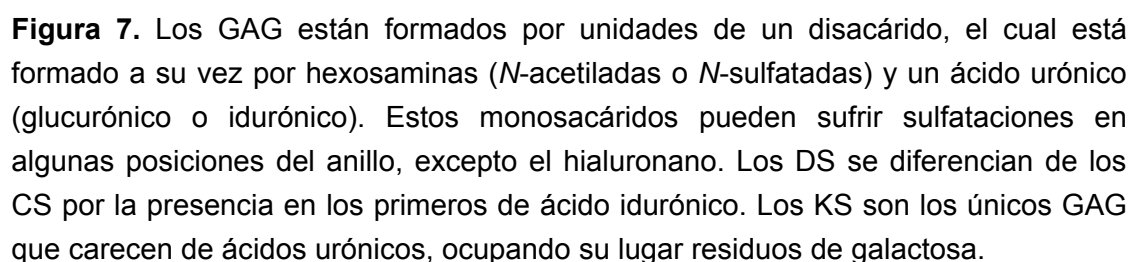
Los gránulos de secreción se encuentran en el interior de células mamarias, plaquetas, linfocitos T y otras células hematopoyéticas. Los PG de los gránulos de secreción participan en el empaquetamiento intracelular de determinados compuestos como proteasas, la heparina o el factor plaquetario 4 (**Figura 6**), regulando así los procesos biológicos resultado de las secreciones, como son la coagulación y la reparación de heridas (Humphries *et al.*, 1999).

La serglycina es la mejor conocida. Su proteína núcleo está codificada por el gen *SRGN* (GenBank™ BC015516) y se caracteriza por ser un péptido resistente a la acción de proteasas con un dominio de anclaje de GAG. Este dominio, de 18 aás., consiste en una repetición de residuos de Ser y Gly alternados (Périn *et al.*, 1988; Stevens *et al.*, 1988; Humphries *et al.*, 1992).

### Glicosaminoglicanos, los «brazos» de los proteoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAG) son largas cadenas de polisacáridos que se unen covalentemente a las proteínas núcleo (Esko *et al.*, 2009). A través de ellos los PG interaccionan con sus diferentes ligandos (Fondeur-Gelinotte *et al.*, 2007; Linhardt y Toida, 2004), aunque existen casos en los que la proteína núcleo también participa en el proceso (Ruoslahti y Yamaguchi, 1991).

La heparina y los heparanos sulfato (HS) son glucosaminoglicanos formados por el disacárido GlcA- $\beta$ 1,4-GlcNAc- $\alpha$ 1,4- o IdoA- $\alpha$ 1,4-GlcNAc- $\alpha$ 1,4-. La heparina se



**Tabla 4.** Tipos de GAG que se unen a los PG. Los GAG no se unen de forma promiscua a las proteínas núcleo, sino que cada una de ellas porta un tipo específico de GAG.

Tipo de PG	Proteína núcleo	Tipo de GAG <sup>[a]</sup>	Referencia
<b>De membrana</b>	Sindecanos	HS, CS, DS	Rapraeger <i>et al.</i> , 1985
	Glipicanos	HS	David <i>et al.</i> , 1990
	CD44	HS, CS KS	Brown <i>et al.</i> , 1991 Funderburgh, 2000
<b>De gránulos de secreción</b>	Serglicina	Heparina, CS	Stevens <i>et al.</i> , 1988
<b>Intersticiales</b>	Agrecano	CS KS <sup>[b]</sup>	Kimura <i>et al.</i> , 1979 Funderburgh, 2000
	Versicano	CS	Krusius <i>et al.</i> , 1987
	Brevicano	CS	Yamada <i>et al.</i> , 1994
	Neurocano	CS	Prange <i>et al.</i> , 1998
	SLRPG	CS, DS, KS <sup>[c]</sup>	Iozzo, 1999
<b>De la membrana basal</b>	Perlecano	HS	Kallunki <i>et al.</i> , 1992; Murdoch <i>et al.</i> , 1992
	Agrina	HS	Tsen <i>et al.</i> , 1995
	Leprecano	C/DS	Wassenhove-McCarthy y McCarthy, 1999
	Colágeno	HS CS <sup>[b]</sup>	Halfter <i>et al.</i> , 1998 Esko <i>et al.</i> , 2009

<sup>[a]</sup> HS se refiere sólo a heparanos sulfato.

<sup>[b]</sup> Lo normal es que el agrecano porte cadenas de CS y el colágeno de HS. En cartílago, no obstante, se han encontrado especies de agrecano y de colágeno XVIII con cadenas de KS y de CS, respectivamente (Funderburgh, 2000; Esko *et al.*, 2009).

<sup>[c]</sup> Dependiendo del tipo de SLRPG tendrá unos GAG u otros. Los de clase I tienen C/DS, los de clase II suelen estar unidos a KS (en córnea) y poli-*N*-acetil lactosamina (en resto de tejidos). El mimecano y el epificano (clase III) están decorados con KS y C/DS respectivamente.

encuentra casi exclusivamente en el tejido conectivo y en las células mamarias, mientras que los HS están presentes en la práctica totalidad de los tejidos.<sup>[4]</sup>

Existen otros GAG como los queratanos sulfato (KS), formados por poli-*N*-acetil lactosamina (Gal- $\beta$ 1,4-GlcNAc- $\beta$ 1,3-), y el hialuronano,<sup>[5]</sup> formado por el disacárido

<sup>[4]</sup> La heparina es un derivado hipersulfatado de los HS. Presenta el mismo esqueleto que éstos, diferenciándose en las modificaciones que sufren las cadenas y en la longitud de las mismas (Yanagishita y Hascall, 1992; Esko *et al.*, 2009). De aquí en adelante, cuando se mencione HS en el texto deberá entenderse como «heparina y heparanos sulfato», a no ser que se especifique lo contrario.

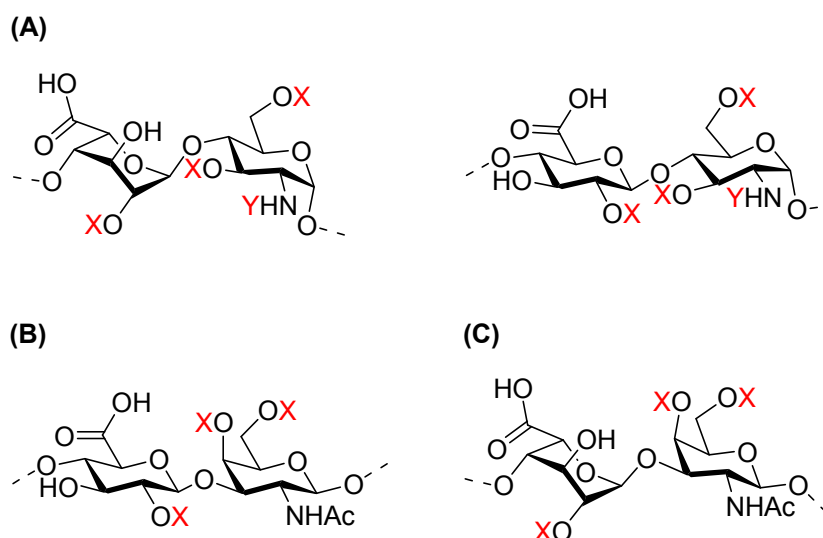


GlcA- $\beta$ 1,3-GlcNAc- $\beta$ 1,4- y que se mantiene libre en la MEC sin unirse a una proteína núcleo. Estas dos últimas familias de GAG quedan fuera del ámbito de la presente memoria, centrándose ésta en los PG de HS, CS y DS.

Los GAG no se unen indiscriminadamente a cualquier proteína núcleo (**Tabla 4**), de lo que se deduce que debe existir un mecanismo biosintético que permita a las células discriminar entre los diferentes tipos de GAG. El mecanismo exacto de control permanece desconocido, aunque se sabe que la presencia aminoácidos aromáticos y/o ácidos alrededor del sitio de glicosilación favorecen la unión de HS frente a C/DS (Zhang y Esko, 1994; Zhang *et al.* 1995). Sobre este aspecto se discutirá en detalle más adelante.

**Las modificaciones en los monosacáridos de los GAG son vitales para la unión entre los PG y las moléculas diana**

Las cadenas de GAG presentan modificaciones químicas en los monosacáridos que son esenciales para su función biológica (Yanagishita y Hascall, 1992). Éstas consisten en la sulfatación de determinados residuos y en la epimerización de GlcA a IdoA (**Figura 8**). Las modificaciones dependen del tipo de GAG que se esté



**Figura 8.** Modificaciones que pueden sufrir los monosacáridos que forman la heparina y los HS (**A**), CS (**B**) y DS (**C**), donde X = H, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Y = AcO<sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Estas modificaciones generan una amplia variedad de estructuras que pueden encontrarse en los GAG.

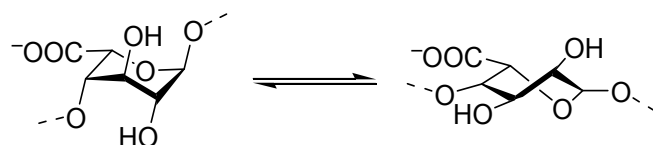
<sup>[5]</sup> Se ha optado por hialuronano en vez de ácido hialurónico debido a que esta última denominación es antigua y se encuentra en desuso (Hascall y Esko, 2009).

generando, son específicas de tejido (Kato *et al.*, 1994; Aikawa *et al.*, 2001; Ledin *et al.*, 2004) y permiten generar secuencias de reconocimiento específicas. Las sulfataciones, además, proporcionan a los GAG su característica carga negativa (Ruoslahti y Yamaguchi, 1991).

La epimerización del C-5 de los residuos de GlcA, pasando de  $\beta$ -D-GlcA a  $\alpha$ -L-IdoA, se da tanto en las cadenas de HS como en las de DS. Los residuos de IdoA presentan tres conformaciones estructurales ( $^1C_4$ ,  $^4C_1$  o  $^2S_0$ ) frente a la única conformación  $^4C_1$  del GlcA (Mulloy y Forster, 2000) (**Figura 9**). Así, no sólo aportan variabilidad estructural a las cadenas, sino que las dotan de mayor flexibilidad, algo muy importante para las interacciones con los distintos ligandos (Ferro *et al.*, 1990).

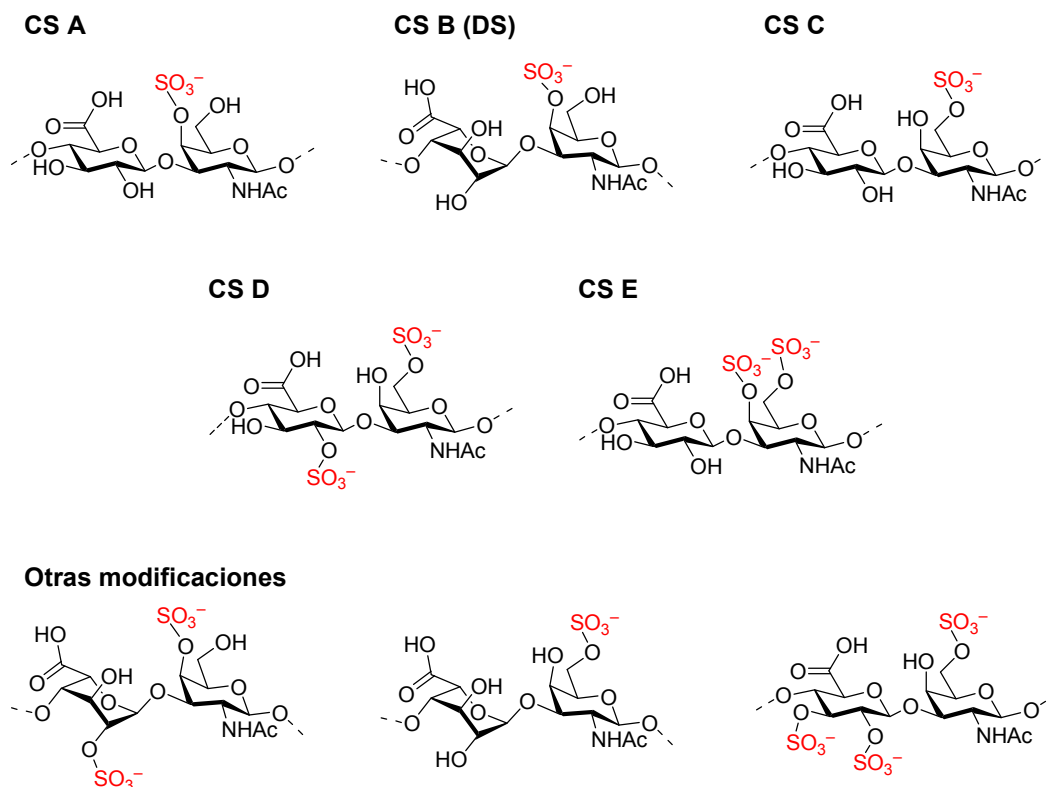
Las cadenas de CS pueden estar sulfatadas en el hidroxilo 4 del residuo de GalNAc (condroitinas 4-sulfato, también llamadas CS A), en el hidroxilo 6 (condroitinas 6-sulfato o CS C) o en ambos a la vez (CS E). Cuando los GlcA son epimerizados, las cadenas son de DS (o CS B<sup>[6]</sup>) (**Figura 10**). Otras modificaciones menos habituales son: la 6-O-sulfatación de la GalNAc y la 2-O-sulfatación de IdoA en los DS (Cheng *et al.*, 1994) y la 2-O-sulfatación en los GlcA del CS C (transformándose en CS D) (Kobayashi *et al.*, 1999).

Mientras que en los C/DS las modificaciones se dan en una forma aparentemente desordenada, en el caso de la heparina y los HS se pueden detectar zonas de la cadena en las que determinadas modificaciones se dan con mayor proporción que otras, identificándose así tres tipos de dominios (**Figura 11**). Los dominios NA son zonas con alta concentración del disacárido GlcA–GlcNAc. Los dominios NS o N-sulfatados son ricos en IdoA–GlcNS, donde el residuo de glucosamina sufre un doble proceso de N-desacetilación/N-sulfatación. Finalmente, en los dominios NA/NS se alternan GlcNAc y GlcNS (Maccarana *et al.*, 1996). La composición relativa de dominios NA, NS y NA/NS depende del tipo celular (Esko y Selleck, 2002; Ledin *et al.*,



**Figura 9.** Equilibrio conformacional entre las formas de silla ( $^1C_4$ ) y bote ( $^2S_0$ ) del ácido idurónico.

<sup>[6]</sup> El término de CS B para referirse al DS está en desuso.



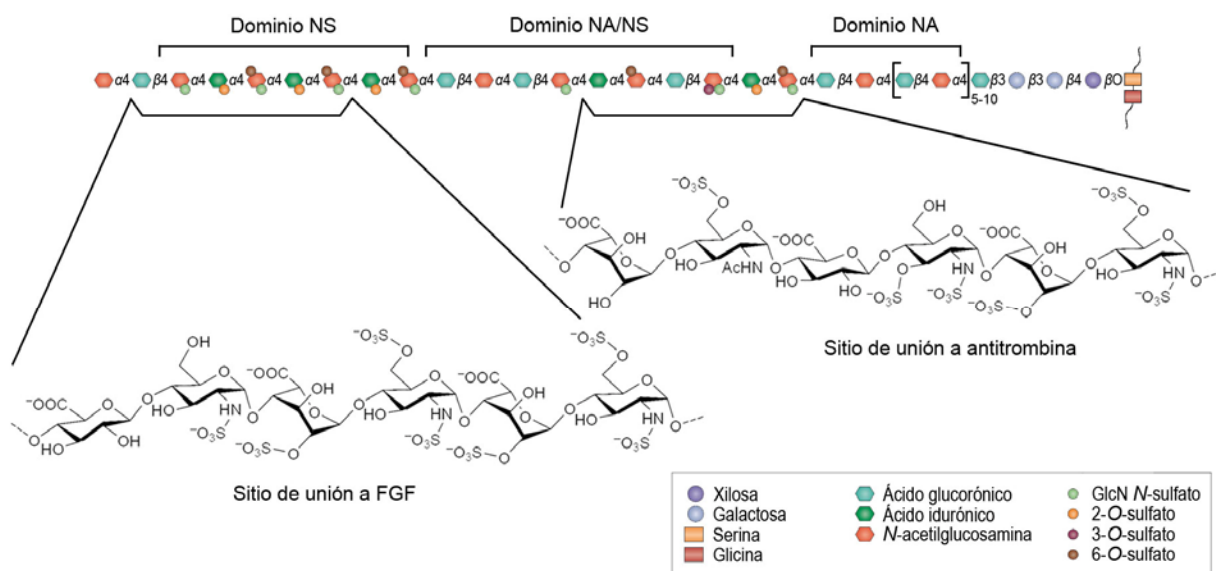
**Figura 10.** Algunas modificaciones encontradas en C/DS. Estos galactosaminoglicanos se clasifican atendiendo al tipo de disacárido que forman las cadenas.

2004), es independiente del tipo de proteína núcleo a la que se unen (Kato *et al.*, 1994) y puede cambiar durante el desarrollo celular (Fedarko y Conrad, 1986).

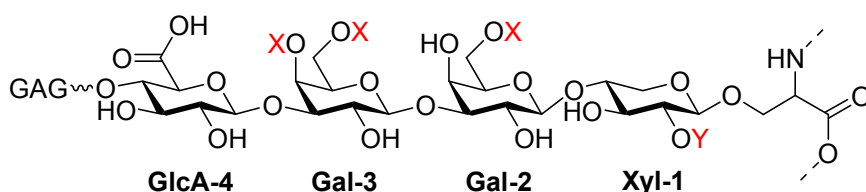
Las modificaciones más habituales en los HS son la 6-O-sulfatación de los residuos de GlcNAc (concentradas en las zonas NS y NA/NS), la epimerización de GlcA a IdoA (zonas NS y NA/NS) y la 2-O-sulfatación de este último (zona NS) (Maccarana *et al.*, 1996). Existen otras modificaciones menos habituales como la 2-O-sulfatación del GlcA y la 3-O-sulfatación de la GlcNAc, que son tan importantes para la actividad biológica como las primeras (Esko y Selleck, 2002).

### **La unión entre la proteína núcleo y los GAG se da a través de un tetrasacárido conector unido a serina**

La unión entre el GAG y la proteína se da a través de una estructura altamente conservada de cuatro monosacáridos denominada tetrasacárido conector, que se une covalentemente a la proteína mediante un enlace glucosídico con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de una serina. La secuencia del tetrasacárido conector es GlcA- $\beta$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,4-Xyl- $\beta$ 1,O-Ser (**Figura 12**). Esta estructura es la misma para HS (Lindahl y Rodén, 1965) y C/DS (Lindahl y Rodén, 1966).



**Figura 11.** Representación de los diferentes dominios que presentan las cadenas de HS, los dominios *N*-sulfatados (NS), *N*-acetilados (NA) y de sulfatación variable (NA/NS). Estos dominios contienen sitios específicos de unión, por ejemplo, a FGF<sup>[7]</sup> y trombina. Puede apreciarse como el sitio de unión a trombina presenta residuos con modificaciones no habituales, como el GlcA 3-O-sulfato, que es indispensable para que se de la unión a trombina/antitrombina (Petitou *et al.*, 1999, 2001). Adaptada de Esko *et al.* (2009).



**Figura 12.** Estructura del tetrasacárido conector unido a la cadena lateral de una serina. Los residuos se numeran por proximidad a la proteína núcleo. Al igual que en los GAG, pueden encontrarse modificaciones en los azúcares que forman el tetrasacárido conector. X = H, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Y = H, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

Al igual que ocurre en los monosacáridos que forman los GAG, los azúcares del tetrasacárido conector pueden presentar una serie de modificaciones (**Figura 12**). Para los C/DS se han encontrado sulfataciones en las Gal-2 y -3 (Sugahara *et al.*, 1988; Sugahara *et al.*, 1992a; de Waard *et al.*, 1992; Sugahara *et al.*, 1995) y una 2-O-fosforilación en Xyl-1 (Oegema *et al.*, 1984; Sugahara *et al.*, 1992a). Para los HS no se han descrito modificaciones en los dos residuos de Gal (Sugahara *et al.*, 1992b), pero sí la 2-O-fosforilación de Xyl-1 (Fransson *et al.*, 1985).

<sup>[7]</sup> Factor de crecimiento de fibroblastos, de Fibroblast Grow Factor, en inglés.

El papel de estas modificaciones permanece desconocido, aunque se sabe que afectan a determinadas enzimas implicadas en la biosíntesis (Kitagawa *et al.*, 1995; Lidholt *et al.*, 1997; Gulberti *et al.*, 2005; Tone *et al.*, 2008) y degradación (Takagaki *et al.*, 1992) de los PG, por lo que se ha propuesto un posible papel en la maduración de los GAG y la dicotomía HS vs C/DS (Sugahara y Kitagawa, 2000, 2002; Tone *et al.*, 2008). Este aspecto se discutirá en detalle más adelante.

## ***Biosíntesis de proteoglicanos***

La biosíntesis de proteoglicanos, tal y como aparece representada en la **Figura 13**, es un proceso secuencial y ordenado (Jacobsson y Lindahl, 1980; Habuchi, 2000) que se da en las cisternas del aparato de Golgi; todas las enzimas implicadas en la biosíntesis de los GAG son proteínas transmembranales de tipo II localizadas en el aparato de Golgi y la red de trans-Golgi (Esko *et al.*, 2009).

Se podría decir, a grandes rasgos, que el proceso es realizado como en una cadena de montaje, donde el producto resultante de cada reacción enzimática sirve de sustrato para el siguiente paso de biosíntesis (Esko y Selleck, 2002; Whitelock e Iozzo, 2005).

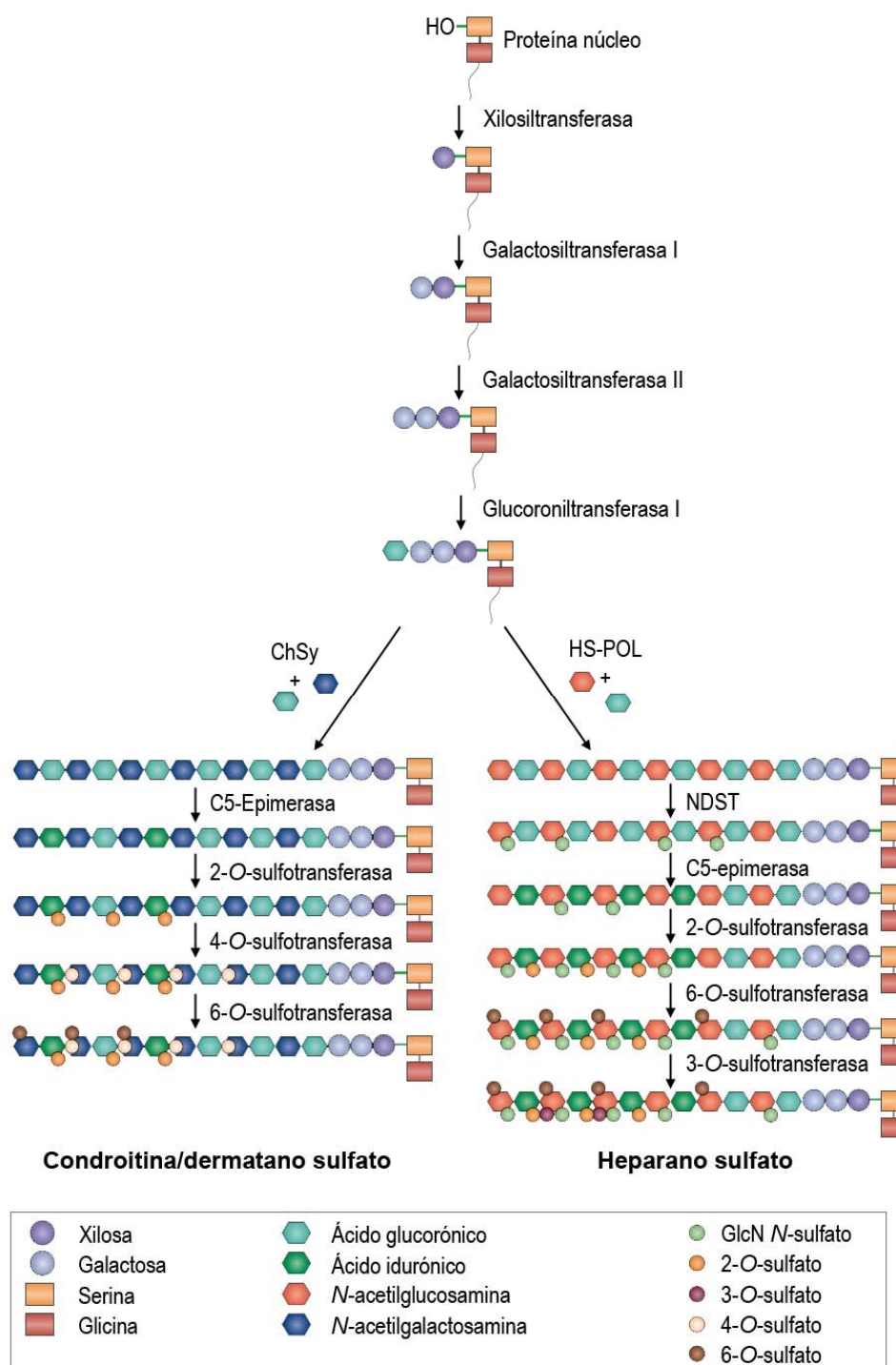
Muchas de las enzimas implicadas pueden interaccionar entre ellas, por lo que se ha propuesto que grandes complejos multienzimáticos (denominados «gagosomas») dirigen la biosíntesis y son regulados de manera conjunta (Yanagishita y Hascall, 1992; Esko y Selleck, 2002; Pavão *et al.*, 2006).

A pesar de la gran cantidad de enzimas necesarias y el elevado número de pasos que se suceden, la biosíntesis de un proteoglicano es un proceso muy rápido, con un tiempo medio de 15-20 minutos (Campbell y Schwartz, 1988; Yanagishita y Hascall, 1992). Una vez sintetizados, los nuevos PG son rápidamente transportados a la membrana plasmática (Egeberg *et al.*, 2001; Arneson y Miller, 2007).

## **Formación del tetrasacárido conector**

La biosíntesis de los GAG cuenta con un primer paso común en HS y C/DS: la formación del tetrasacárido conector. Todas las proteínas núcleo, por tanto, van a pasar por la misma vía biosintética y de regulación, lo que implica que competirán

entre ellas por ser sustratos de las enzimas que formarán el tetrasacárido (Esko y Selleck, 2002).



**Figura 13.** Esquema de la biosíntesis de proteoglicanos. El proceso no es lineal, como se ha representado en la figura, pero sí secuencial. Algunos pasos de modificación se dan a la vez que la polimerización, unos son dependientes de modificaciones previas y otros son independientes del estado de la cadena. ChSy, condroitina sintasa; HS-POL, heparano sulfato polimerasa; NDST, N-desacetilasa/ N-sulfotransferasa. Modificación de una figura de Häcker *et al.* (2005).

El tetrasacárido conector se forma por la acción secuencial de cuatro glicosiltransferasas, que aparecen recogidas en la **Tabla 5**: xilosiltransferasa (XT), galactosiltransferasa I (GalT-I) o  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa 7 (B4GALT7), galactosiltransferasa II (GalT-II) o  $\beta$ -1,3-galactosiltransferasa 6 (B3GALT6) y glucuroniltransferasa I (GlcAT-I) o  $\beta$ -1,3-glucuronosiltransferasa 3 (B3GAT3). Dos de ellas, GalT-I y GlcAT-I son de velocidad limitante (Salimath *et al.*, 1995; Bai *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2002; Takemae *et al.*, 2003). Las cuatro proteínas son únicas, excepto la XT de la que se conocen dos isoformas, que se diferencian ligeramente en sus patrones de expresión (Götting *et al.*, 2000) y en su especificidad de sustrato (Carrera Casanova *et al.*, 2008).

El paso clave es la formación del enlace glucosídico entre la xilosa y la serina de la proteína núcleo. La XT reconoce determinadas secuencias de la proteína, aunque no existe una secuencia consenso propiamente dicha (Wilson, 2004). Pero sí existen determinados patrones que se repiten: una secuencia SGD a menudo flanqueada por las «cajas ácidas», que son secuencias ricas en aminoácidos ácidos (Esko y Zhang, 1996; Wilson, 2004; Whitelock e Iozzo, 2005).

Una vez añadido el primer residuo de Xyl, actúan las otras tres GT implicadas. Estas tres proteínas muestran una especificidad de sustrato bastante restringida para

**Tabla 5.** Genes y proteínas implicados en la biosíntesis de proteoglicanos (I). Enzimas que intervienen en la formación del tetrasacárido conector.

Proteína	Gen <sup>[a]</sup>	Actividad biosintética	Referencias
Xilosiltransferasa I (XT-I)	<i>XT-I</i> (AJ277441) <sup>[b]</sup>	Anclaje de la Xyl a la cadena lateral de la Ser	Götting <i>et al.</i> , 2000; Kuhn <i>et al.</i> , 2001
Xilosiltransferasa II (XT-2)	<i>XT-II</i> (AJ277442)	Anclaje de la Xyl a la cadena lateral de la Ser	Götting <i>et al.</i> , 2000
Galactosiltransferasa I (GalT-I, B4GALT7)	<i>B4GALT7</i> (BC007317)	Adición de Gal a Xyl-Ser	Almeida <i>et al.</i> , 1999; Okajima <i>et al.</i> , 1999a
Galactosiltransferasa II (GalT-II, B3GALT6)	<i>B3GALT6</i> (AY050570) <sup>[c]</sup>	Adición de Gal a Gal-Xyl-Ser	Bai <i>et al.</i> , 2001
Glucuroniltransferasa I (GlcAT-I)	<i>GLCAT-1</i> (AB009598)	Adición de GlcA a Gal-Gal-Xyl-Ser	Kitagawa <i>et al.</i> , 1998; Wei <i>et al.</i> , 1999

<sup>[a]</sup> Se indica el nombre oficial del gen humano y su número de acceso al GenBank<sup>TM</sup> (entre paréntesis).

<sup>[b]</sup> Para la XT-I se clonó primero el extremo catalítico, pero el extremo 5' transmembranal ya está descrito (número de acceso en GenBank<sup>TM</sup> AJ539163).

<sup>[c]</sup> La secuencia con número de acceso AY050570, correspondiente a GalT-II (Bai *et al.*, 2001) fue asignada por error a una  $\beta$ 1,3-glucosaminiltransferasa (Zhou *et al.*, 1999). Los números de acceso para la  $\beta$ 1,3-GlcNAcT son AF092050 y AF092051 (ver correcciones a Zhou *et al.*, 1999).

los residuos aceptores, a pesar de que los otros miembros de sus respectivas familias presentan especificidades muy distintas y de más amplio espectro. Por ejemplo, GalT-I muestra especificidad por la xilosa como sustrato aceptor, en vez de Glc o GlcNAc, lo habitual en el resto de la familia de las  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasas (Helting y Rodén, 1969; Almeida *et al.*, 1999; Okajima *et al.*, 1999a).

***Los  $\beta$ -D-xilopiranosidos pueden iniciar artificialmente la biosíntesis de GAG: los xilopiranosidos como «aceptores trampa» de la enzima B4GALT7***

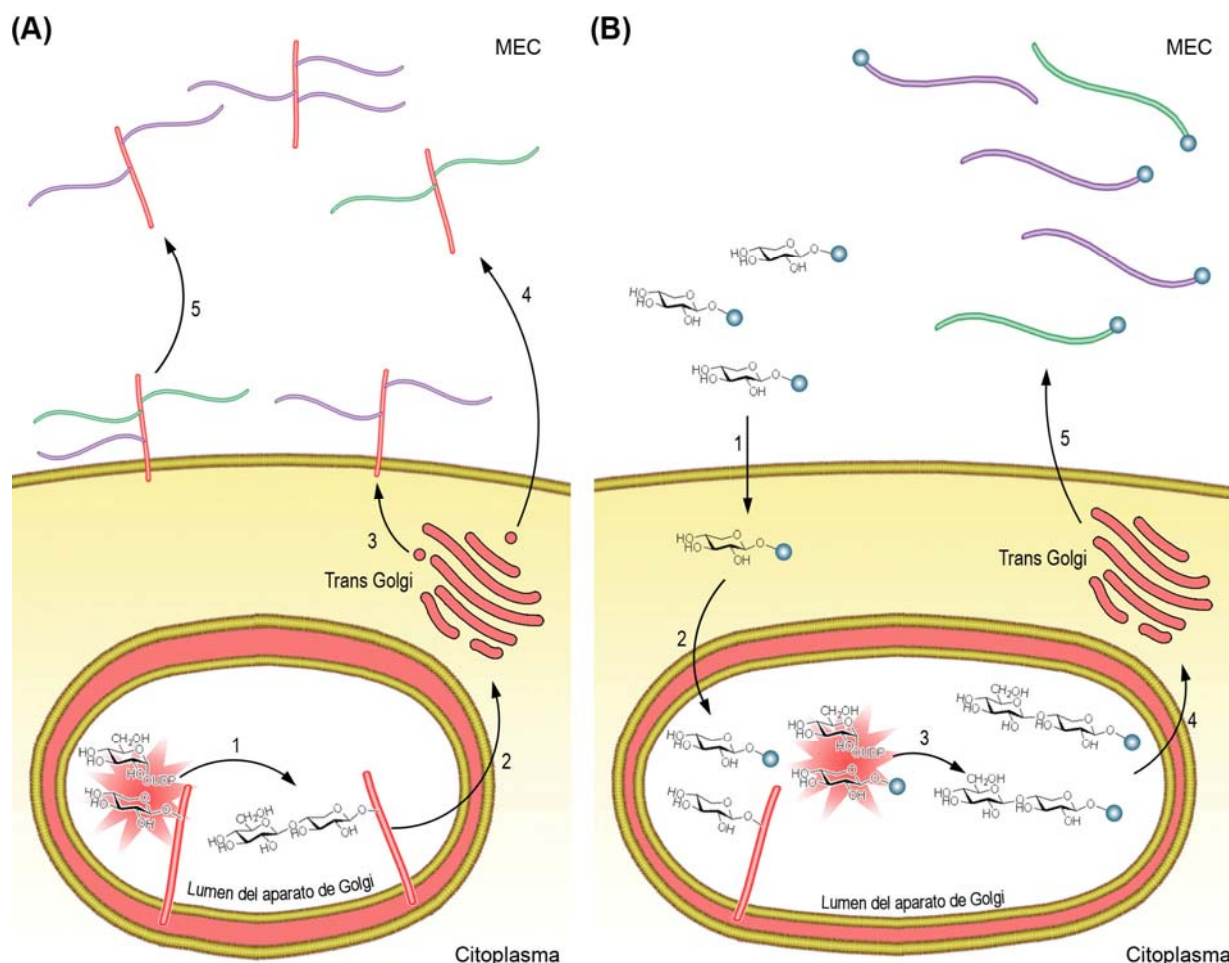
Un aspecto en el que merece la pena detenerse un momento es el hecho de que la xilosa y los xilopiranosidos con aglicones hidrófobos pueden cebar la biosíntesis de GAG en cultivos celulares (Helting y Rodén, 1969; Okayama *et al.*, 1973; Schwartz *et al.*, 1974a).

Los xilopiranosidos pueden penetrar las membranas celulares y fluir hacia el aparato de Golgi (Sarkar *et al.*, 1995), donde se realiza la biosíntesis de los GAG. Allí, son capaces de secuestrar la actividad de la enzima B4GALT7 (GalT-I) actuando como aceptores en el paso de galactosilación y compitiendo así con los productos endógenos (Kolset *et al.*, 1990). En una concentración adecuada, estos compuestos pueden llegar a interrumpir totalmente el metabolismo de los PG, bloqueando por completo la galactosilación de las proteínas núcleo (Helting y Rodén, 1969; Okayama *et al.*, 1973; Schwartz *et al.*, 1974a; Sobue *et al.*, 1987; Fransson *et al.*, 1992) y generando así una gran cantidad de GAG «artificiales» que se excretan al medio extracelular (**Figura 14**). Al contrario de lo que ocurre con los PG naturales, los GAG generados artificialmente son excretados cuantitativamente a la matriz extracelular y no se intercambian con los anclados a membrana (Johnston y Keller, 1979). Esto es debido a que los aglicones no son lo suficientemente voluminosos como para permanecer retenidos en la membrana celular (Lugemwa *et al.*, 1996).

**Polimerización del glicosaminoglicano**

La polimerización de las cadenas de GAG es un proceso complicado en el que actúan varias enzimas de forma coordinada, y que aparecen recogidas en la **Tabla 6**. Se divide en dos pasos diferenciados, la iniciación de la cadena de HS o C/DS (la adición del primer residuo de la cadena tras la formación del tetrasacárido conector) y la extensión de la cadena de GAG añadiendo las unidades de disacárido hasta su





**Figura 14.** Síntesis de PG en ausencia y presencia de xilopiranósidos en el MEC. **(A)** La enzima B4GALT7 (GalT-I) añade un residuo de Gal a la Xyl de la proteína núcleo (1). Los PG continúan su proceso de biosíntesis en otras zonas del aparato de Golgi (2) y, una vez terminados, viajan mediante el sistema de vesículas a la membrana (3) o directamente a la MEC (4). Los PG de membrana pueden liberarse al medio (5) mediante proteasas y fosfolipasas. **(B)** Los xilopiranósidos con aglicones hidrófobos pueden penetrar a través de la membrana citoplasmática al interior celular (1) y de ahí moverse a otras zonas (2). En el aparato de Golgi son capaces de «secuestrar» a B4GALT7 actuando como aceptores (3). Esto hace que las proteínas núcleo xilosiladas no sean galactosiladas, abortándose así la biosíntesis de PG. Los disacáridos generados actúan como aceptores del resto de la maquinaria biosintética (4), generando GAG libres que son excretados al MEC (5).

terminación y modificación. En ambos casos existen varias actividades enzimáticas repartidas en distintas proteínas. En el caso de las CS, la actividad  $\beta$ -GalNAcT-I se encarga de iniciación de la cadena añadiendo un residuo de GalNAc al extremo no reductor del tetrasacárido conector (Rohrmann *et al.*, 1985). Después, las actividades

$\beta$ -GalNAcT-II y  $\beta$ 3-GlcAT-II<sup>[8]</sup> elongan la cadena añadiendo GalNAc y GlcA, respectivamente (Silbert y Reppucci, 1976; Rohrmann *et al.*, 1985). Para los HS, la actividad  $\alpha$ -GlcNAcT-I inicia la cadena añadiendo un residuo de GlcNAc al extremo no reductor del tetrasacárido conector (Fritz *et al.*, 1994b), y  $\alpha$ -GlcNAcT-II y  $\beta$ 3-GlcAT-II elongan la cadena añadiendo GlcNAc y GlcA, respectivamente (Silbert, 1963).

**Tabla 6.** Genes y proteínas implicados en la biosíntesis de proteoglicanos (II). Enzimas implicadas en la polimerización y extensión de las cadenas de HS y C/DS.

GAG	Proteína	Gen <sup>[a]</sup>	Actividad biosintética	Ref.
Condroitina/dermatano sulfato	$\beta$ -1,4- <i>N</i> -acetil-galactosaminiltransferasa 1 (CSGalNAcT-1)	CGALNACT1 (AB071403)	$\beta$ -GalNAcT-I y II: iniciación y elongación de la cadena	Uyama <i>et al.</i> , 2002 Gotoh <i>et al.</i> , 2002b
	$\beta$ -1,4- <i>N</i> -acetil-galactosaminiltransferasa 2 (CSGalNAcT-2)	CSGALNACT2 (AB079252)	$\beta$ -GalNAcT-I y II: función <i>in vivo</i> desconocida	Uyama <i>et al.</i> , 2003 Sato <i>et al.</i> , 2003
	Condroitina sintasa 1 (ChSy-1, CSS-1)	CHSY1 (AB071402)	$\beta$ -GalNAcT-I y $\beta$ -GlcAT-II: extensión de la cadena	Kitagawa <i>et al.</i> , 2001
	Condroitina sintasa 2 (ChSy-2, CSS-3)	CHSS3 (AB086062)	Chaperona de ChSy-1 y ChSy-3, con actividades $\beta$ -GalNAcT-II y $\beta$ 3-GlcAT-II	Yada <i>et al.</i> , 2003b
	Condroitina sintasa 3 (ChSy-3, CSGlcAT, ChPF-2)	CSGLCAT (AB037823)	$\beta$ -GalNAcT-II y $\beta$ 3-GlcAT-II: extensión de la cadena	Gotoh <i>et al.</i> , 2002a
	Factor de polimerización de condroitina (ChPF, CSS-2)	CHPF (AB095813)	Chaperona de ChSy-1 y ChSy-3, con actividades $\beta$ -GalNAcT-II y $\beta$ 3-GlcAT-II	Kitagawa <i>et al.</i> , 2003 Yada <i>et al.</i> , 2003a
Heparano sulfato/heparina	$\alpha$ -1,4- <i>N</i> -acetil-glucosaminiltransferasa IA (EXTL2)	EXTL2 (AF000416)	$\beta$ -GlcNAcT-I: adición de GlcNAc al tetrasacárido conector	Kitagawa <i>et al.</i> , 1999
	$\alpha$ -1,4- <i>N</i> -acetil-glucosaminiltransferasa IB y $\alpha$ -1,4- <i>N</i> -acetil-glucosaminiltransferasa IIB (EXTL3)	EXTL3 (AF001690)	$\beta$ -GlcNAcT-I y $\beta$ -GlcNAcT-II: iniciación y elongación de la cadena	Kim <i>et al.</i> , 2001
	Copolimerasa EXT1	EXT1 (S79639)	$\beta$ -GlcNAcT-II y $\beta$ 4-GlcAT-II: Polimerización del HS	Lind <i>et al.</i> , 1998
	Copolimerasa EXT2	EXT2 (BC010058)	$\beta$ -GlcNAcT-II y $\beta$ 4-GlcAT-II: polimerización del HS	Senay <i>et al.</i> , 2000
	$\alpha$ -1,4- <i>N</i> -acetil-glucosaminiltransferasa IIA (EXTL1)	EXTL1 (BC065528)	$\beta$ -GlcNAcT-II: polimerización del HS	Kim <i>et al.</i> , 2001

<sup>[a]</sup> Se indica el nombre oficial del gen humano y su número de acceso al Gen Bank<sup>TM</sup> (entre paréntesis).

<sup>[8]</sup> En la literatura, esta actividad es conocida normalmente como  $\beta$ -GlcAT-II, pero aquí menos optado por la forma  $\beta$ 3-GlcAT-II para diferenciarla de la actividad  $\beta$ 4-GlcAT-II necesaria en la polimerización de los HS.

### ***Iniciación de las cadenas de HS y C/DS***

Después de la formación del tetrasacárido conector se produce la bifurcación que conducirá por un lado a la biosíntesis de HS y por otro a la formación de C/DS. Si al GlcA del tetrasacárido conector se añade una GlcNAc mediante un enlace  $\alpha(1\rightarrow4)$  la biosíntesis se encaminará hacia la formación de HS. Si por el contrario se forma un enlace  $\beta(1\rightarrow4)$  entre una GalNAc y el GlcA del tetrasacárido, se generarán C/DS.

En las condroitinas sulfato, el proceso de iniciación corresponde a la enzima CSGalNAcT-1 (Gotoh *et al.*, 2002b; Uyama *et al.*, 2002), que presenta una actividad dual  $\beta$ -GalNAc-TI (iniciación de la cadena) y  $\beta$ -GalNAcT-II (elongación). Existe una segunda enzima conocida como CSGalNAcT-2 que también presenta ambas actividades *in vitro* y con un 60 % de homología de secuencia (Sato *et al.*, 2003; Uyama *et al.*, 2003). CSGalNAcT-1 presenta mayor actividad iniciadora que elongadora, todo lo contrario que CSGalNAcT-2, que además muestra especial predilección por cadenas de CS ya sulfatadas (Sato *et al.*, 2003). La existencia de esta redundancia funcional podría implicar que ambas proteínas se alternan dependiendo del tejido, vistos sus diferentes patrones de expresión (Uyama *et al.*, 2002; Gotoh *et al.*, 2002b; Uyama *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003), o que cada forma puede reconocer diferentes secuencias de la proteína núcleo (Uyama *et al.*, 2003).

En la heparina y los heparanos sulfato los genes implicados en la iniciación de las cadenas pertenecen a la familia EXT: *EXTL1*, *EXTL2* y *EXTL3*<sup>[9]</sup> codifican tres glicosiltransferasas. EXTL1 presenta actividad  $\alpha$ -GlcNAcT-II y podría participar en la elongación (Kim *et al.*, 2001). EXTL2 posee una actividad dual  $\alpha$ -GalNAcT/ $\alpha$ -GlcNAcT-I y parece estar implicada en la iniciación (Kitagawa *et al.*, 1999). EXTL3 es una enzima con actividad dual  $\alpha$ -GlcNAcT-I/ $\alpha$ -GlcNAcT-II y parece implicada en la iniciación, elongación e incluso terminación (Kim *et al.*, 2001; Busse *et al.*, 2007). Aunque existe una redundancia funcional, cada proteína presenta una mezcla de actividades única. Esta redundancia puede responder a que cada enzima reconozca una secuencia diferente en la proteína núcleo (Esko y Zhang, 1996; Kim *et al.*, 2001).

---

<sup>[9]</sup> EXTL proviene de «EXT Like genes», en inglés. Son genes similares a EXT1 y EXT2 (ver más adelante), los cuales están implicados en la polimerización de la cadena de glucosaminoglicano (Sugahara y Kitagawa, 2002).

### **Polimerización de las cadenas de CS**

Lejos de ser un proceso sencillo, la elongación de las CS implica la actuación de varias enzimas de manera coordinada. Las identificadas a fecha de hoy con las actividades  $\beta$ 3-GlcAT-II y  $\beta$ -GalNAcT-II son la condroitina sintasa 1 (ChSy-1) (Kitagawa *et al.*, 2001), ChSy-2 (Yada *et al.*, 2003b), ChSy-3 (Gotoh *et al.*, 2002a), el factor de polimerización de condroitina (ChPF) (Kitagawa *et al.*, 2003; Yada *et al.*, 2003a) y la ya mencionada CSGalNAcT-2. Todas ellas se expresan de forma ubicua en el organismo, aunque con ligeras diferencias (Izumikawa *et al.*, 2008).

Excepto CSGalNAcT-2, que sólo posee la actividad  $\beta$ -GalNAcT-II, el resto de enzimas poseen una actividad dual  $\beta$ 3-GlcAT-II/ $\beta$ -GalNAcT-II,<sup>[10]</sup> pero para que se manifieste las enzimas deben co-expresarse dos a dos (Izumikawa *et al.*, 2007; 2008). Por ejemplo ChSy-1 no muestra actividad polimerasa *in vitro* por sí sola (Kitagawa *et al.*, 2003), pero si es co-expresada con ChPF, la actividad aumenta considerablemente (Yada *et al.*, 2003a; Kitagawa *et al.*, 2003).

Se cree que las proteínas ChSy-1 y ChSy-3 actúan como polimerasas, mientras que ChPF y ChSy-2 actúan como chaperonas. Ya que cada pareja polimerasa/chaperona presenta una especificidad distinta que las otras por las proteínas núcleo, cada combinación jugaría un papel único en la biosíntesis de CS (Izumikawa *et al.*, 2008).

### **Polimerización de los HS**

En la polimerización de las cadenas de HS participan las proteínas codificadas por los genes *EXT1*, *EXT2*<sup>[11]</sup> y los mencionados *EXTL1* y *EXTL3*.

*EXT1* (Lind *et al.*, 1998; McCormick *et al.*, 1998) y *EXT2* (Senay *et al.*, 2000) son glicosiltransferasas con una actividad dual  $\alpha$ -GlcNAcT-II/ $\beta$ 4-GlcA-TII, actuando como polimerasas de las cadenas de HS de forma similar a las ChSy (Lind *et al.*, 1993). Al igual que estas, ni *EXT1* ni *EXT2* presentan actividad polimerasa *in vitro* (Lind *et al.*, 1998) a no ser que se expresen juntas (Duncan *et al.*, 2001; Busse y Kusche-

---

<sup>[10]</sup> ChSy-3 fue descrita como una glucoronosiltransferasa, por eso fue conocida durante muchos años como CSGlcAT (Gotoh *et al.*, 2002a). Más tarde se detectó que también poseía actividad GalNAcT-II, renombrándose a ChSy-3 (Izumikawa *et al.*, 2008).

<sup>[11]</sup> *EXT1* y *EXT2* son genes supresores de tumores y mutaciones en estos producen exostosis múltiple hereditaria de tipo I y II, respectivamente (Duncan *et al.*, 2001).

Gullberg, 2003; Kim *et al.*, 2003). EXT2 exhibe unas actividades muy débiles (McCormick *et al.*, 2000; Senay *et al.*, 2000; Busse y Kusche-Gullberg, 2003), y se cree que actúa como una chaperona, de forma análoga a ChSy-2/ChPF, y que la actividad polimerasa «real» reside en EXT1 (Busse *et al.*, 2007; Presto *et al.*, 2008).

El papel de EXTL1 y EXTL3 en el proceso de elongación no está claro; aunque poseen actividad elongadora  $\alpha$ -GlcNAcT-II, no se conoce que formen ningún complejo con EXT1 o EXT2 (McCormick *et al.*, 2000). La hipótesis actual afirma que *EXTL1* podría activarse selectivamente en tejidos específicos en fases concretas del desarrollo (Kim *et al.*, 2001) y que EXTL3 podría jugar un papel en la terminación<sup>[12]</sup> de las cadenas de HS (Busse *et al.*, 2007).

## **Maduración de los GAG: modificaciones del esqueleto de los monosacáridos**

El último paso en la biosíntesis de los GAG es el de las modificaciones en el esqueleto de los monosacáridos. Aunque la biosíntesis de PG se ha presentado históricamente como un proceso secuencial de iniciación-elongación-modificación (Esko y Lindahl, 2001), los procesos de elongación y maduración se dan al mismo tiempo, tanto en HS (Lidholt *et al.*, 1989; Lidholt y Lindahl, 1992) como en C/DS (Kitagawa *et al.*, 1997; Gotoh *et al.*, 2002b; Sato *et al.*, 2003).

La biosíntesis y modificación de las cadenas la realiza un complejo multiproteico denominado **gagosoma**, propuesto por Esko y Shelleck (2002). Éste estaría formado por la unión de polimerasas y enzimas modificadoras, de manera que las diferentes isoformas de cada una de estas definirían la longitud y tipo de modificaciones que sufrirá la cadena (Ledin *et al.*, 2006; Izumikawa *et al.*, 2008). En este contexto, la chaperona EXT2 funcionaría como una proteína transportadora encargada de llevar las enzimas biosintéticas del RE hacia el aparato de Golgi, donde van a actuar (Presto

---

<sup>[12]</sup> La terminación de las cadenas de HS y C/DS es un proceso muy poco conocido (Little *et al.*, 2008). Se sabe que las modificaciones afectan a la terminación de las cadenas (Lidholt *et al.*, 1989) y que la sobreexpresión de la N-desacetilasa/N-sulfotransferasa (ver más adelante) produce cadenas de HS más largas de lo habitual (Pikas *et al.*, 2000). En cuanto a las CS, se sabe que las células deficientes para la condroitina 4-sulfotransferasa 1 (C4ST-1), dan lugar a CS más cortas (Uyama *et al.*, 2006), lo que implica que la 4-O-S favorece la elongación de las cadenas de CS. Podría ser que las polimerasas interaccionasen con C4ST-1 para determinar la longitud de la cadena (Izumikawa *et al.*, 2008).

*et al.*, 2008). El mismo papel podría aplicarse a ChSy-2 y ChPF en el caso de la síntesis de C/DS, ya que presentan las mismas características que EXT2.

Las modificaciones se dan de manera ordenada, afectando a la especificidad de la enzima que da el siguiente paso (Kusche-Gullberg y Kjellén, 2003). La mayoría de las enzimas humanas que realizan las modificaciones de las cadenas de HS y C/DS están identificadas y clonadas, mientras que las enzimas modificadoras del tetrasacárido conector permanecen sin identificar.

### **Modificación de las cadenas de CS y DS**

Las enzimas encargadas de modificar las cadenas de C/DS aparecen recogidas en la **Tabla 7**. Las isoformas de las enzimas se diferencian en los patrones de expresión y sus especificidades de sustrato.

Los primeros pasos en la modificación de las cadenas de C/DS son la epimerización de GlcA a IdoA y las 4- y 6-sulfataciones de los residuos de GalNAc, aunque no está claro si son procesos concomitantes o no. La epimerización la realiza la dermatano sulfato epimerasa o DSE (Nakao *et al.*, 2000; Maccarana *et al.*, 2006). Las 4-O-S las realizan las condroitina 4-sulfotransferasas (C4ST), de las que se conocen tres isoformas (Hiraoka *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002) y una cuarta específica para las cadenas de DS, la dermatano 4-sulfotransferasa o D4ST (Evers *et al.*, 2001). De las 6-O-S se encargan las condroitina 6-sulfotransferasas (C6ST), de la que existen dos isoformas en humanos (Mazany *et al.*, 1998; Kitagawa *et al.*, 2000).

Una vez las cadenas de C/DS están 4- o 6-sulfatadas, se producen el resto de modificaciones. Las 2-O-sulfataciones de los residuos de GlcA e IdoA se dan gracias a la acción de una uronil 2-sulfotransferasa o U2ST (Kobayashi *et al.*, 1999) y en último lugar se producen los 4,6-bisulfatos de GalNAc por acción de la GalNAc 4-sulfato 6-O-sulfotransferasa (GALNAC4S-6ST) (Ohtake *et al.*, 2001).

### **Modificación de las cadenas de HS**

La modificación de los HS es un proceso aún más complejo que la modificación de las cadenas de C/DS, debido principalmente a la cantidad de isoformas que hay para cada una de las enzimas implicadas. Estas y los genes que las codifican aparecen recogidos en la **Tabla 8**. Las isoformas se diferencian unas de otras en sus patrones de expresión y sus especificidades de sustrato.

El primer paso es la *N*-desacetilación/*N*-sulfatación de los residuos de GlcNAc y la epimerización y 2-*O*-sulfatación de los ácidos hexurónicos, que se dan de forma casi simultánea y se regulan de manera conjunta (Esko y Selleck, 2002). La ND/NS se produce gracias a la una proteína con actividad dual *N*-desacetilasa/*N*-sulfotransferasa (NDST), de la que existen cuatro isoformas (Aikawa y Esko, 1999; Aikawa *et al.*, 2001).<sup>[13]</sup> La epimerización y 2-*O*-sulfatación de GlcA las realizan dos

**Tabla 7.** Genes y proteínas implicados en la biosíntesis de proteoglicanos (III).  
Enzimas implicadas en la modificación de las cadenas de CS y DS.

Proteína	Gen <sup>[a]</sup>	Actividad biosintética	Ref.
Dermatano sulfato epimerasa (DSE)	<i>DSE</i> (AF098066)	Epimerización reversible de GlcA a IdoA.	Nakao <i>et al.</i> , 2000; Maccarana <i>et al.</i> , 2006
Condroitina 4-sulfotransferasa 1 (C4ST-1)	<i>CHST11</i> (AB042326)	4- <i>O</i> -sulfatación de GalNAc en GlcA-GalNAc	Hiraoka <i>et al.</i> , 2000
Condroitina 4-sulfotransferasa 2 (C4ST-2)	<i>CHST12</i> (AF239822)	4- <i>O</i> -sulfatación de GalNAc en GlcA-GalNAc	Hiraoka <i>et al.</i> , 2000
Condroitina 4-sulfotransferasa 3 (C4ST-3)	<i>CHST13</i> (A120869)	4- <i>O</i> -sulfatación de GalNAc en GlcA-GalNAc	Kang <i>et al.</i> , 2002
Dermatano 4-sulfotransferasa (D4ST)	<i>CHST14</i> (AF401222)	4- <i>O</i> -sulfatación de GalNAc en IdoA-GalNAc	Evers <i>et al.</i> , 2001;
Condroitina 6-sulfotransferasa 1 (C6ST-1)	<i>CHST3</i> (U65637)	6- <i>O</i> -sulfatación de GalNAc en GlcA-GalNAc	Mazany <i>et al.</i> , 1998
Condroitina 6-sulfotransferasa 2 (C6ST-2)	<i>CHST7</i> (AB040711)	6- <i>O</i> -sulfatación de GalNAc en GlcA-GalNAc	Kitagawa <i>et al.</i> , 2000
Uronil 2-sulfotransferasa (U2ST)	<i>UST</i> (AB020316)	2- <i>O</i> -sulfatación de GlcA e IdoA	Kobayashi <i>et al.</i> , 1999
GalNAc 4-sulfato 6-sulfotransferasa (GALNAC4S-6ST)	<i>CHST15</i> (NM_015892)	6- <i>O</i> -sulfatación de GalNAc4S en cadenas de CS A	Ohtake <i>et al.</i> , 2001

<sup>[a]</sup> Se indica el nombre oficial del gen humano y su número de acceso al GenBank<sup>TM</sup> (entre paréntesis).

<sup>[13]</sup> El papel que presentan las isoformas in vivo no está claro. Se cree que la NDST «principal» es NDST1 (Fan *et al.*, 2000; Ringvall *et al.*, 2000; Ledin *et al.*, 2004; Presto *et al.*, 2008). NDST2 es la encargada de sintetizar la heparina en los mastocitos (Forsberg *et al.*, 1999; Humphries *et al.*, 1999; Ledin *et al.*, 2004; Ledin *et al.*, 2006) y NDST3 actuaría en el cerebro (Pallerla *et al.*, 2008).

**Tabla 8.** Genes y proteínas implicados en la biosíntesis de proteoglicanos (IV). Enzimas implicadas en la modificación de las cadenas de HS.

Proteína	Gen <sup>[a]</sup>	Actividad biosintética	Referencia
<i>N</i> -desacetilasa/ <i>N</i> -sulfotransferasa 1 (NDST-1)	<i>NDST1</i> (U18918)	<i>N</i> -desacetilación y <i>N</i> - sulfatación de GlcNAc en los HS	Dixon <i>et al.</i> , 1995
<i>N</i> -desacetilasa/ <i>N</i> -sulfotransferasa 2 (NDST-2)	<i>NDST2</i> (U36601)	<i>N</i> -desacetilación y <i>N</i> - sulfatación de GlcNAc en HS y heparina	Humphries <i>et al.</i> , 1998
<i>N</i> -desacetilasa/ <i>N</i> -sulfotransferasa 3 (NDST-3)	<i>NDST3</i> (AF074924)	<i>N</i> -desacetilación y <i>N</i> - sulfatación de GlcNAc en los HS	Aikawa y Esko, 1999
<i>N</i> -desacetilasa/ <i>N</i> -sulfotransferasa 4 (NDST-4)	<i>NDST4</i> (AB036429)	<i>N</i> -desacetilación y <i>N</i> - sulfatación de GlcNAc en los HS	Aikawa <i>et al.</i> , 2001
HS GlcA epimerasa (GLCE)	<i>GLCE</i> (AB020643)	Epimerización de GlcA $\beta$ 3 a IdoA $\alpha$ 3	Crawford <i>et al.</i> , 2001 <sup>[b]</sup>
HS 2-sulfotransferasa 1 (H2OST)	<i>HS2ST1</i> (AB007917)	2-O-sulfatación de GlcA e IdoA	Kobayashi <i>et al.</i> , 1997 <sup>[b]</sup>
HS 6-sulfotransferasa 1 (H6OST-1)	<i>HS6ST1</i> (AB006179)	6-O-sulfatación de GlcNAc <sup>[c]</sup> y GlcNS	Habuchi <i>et al.</i> , 1998
HS 6-sulfotransferasa 2 (H6OST-2)	<i>HS6ST2</i> (AB067776)	6-O-sulfatación de GlcNAc <sup>[c]</sup> y GlcNS	Habuchi <i>et al.</i> , 2003
HS 6-sulfotransferasa 3 (H6OST-3)	<i>HS6ST3</i> (AF539426)	6-O-sulfatación de GlcNAc <sup>[c]</sup> y GlcNS	Habuchi <i>et al.</i> , 2000 <sup>[b]</sup>
HS 3-sulfotransferasa 1 (H3OST-1)	<i>HS3ST1</i> (AF019386)	3-O-sulfatación de GlcNS y GlcNS6S	Shworak <i>et al.</i> , 1997
HS 3-sulfotransferasa 2 (H3OST-2)	<i>HS3ST2</i> (AF105374)	3-O-sulfatación de GlcNS	Shworak <i>et al.</i> , 1999
HS 3-sulfotransferasa 3 <sub>A</sub> (H3OST-3A1)	<i>HS3ST3A1</i> (AF105376)	3-O-sulfatación de GlcN, GlcNS y GlcN6S	Shworak <i>et al.</i> , 1999
HS 3-sulfotransferasa 3 <sub>B</sub> (H3OST-3B1)	<i>HS3ST3B1</i> (AF105377)	3-O-sulfatación de GlcN, GlcNS y GlcN6S	Shworak <i>et al.</i> , 1999
HS 3-sulfotransferasa 4 (H3OST-4)	<i>HS3ST4</i> (AF105378)	3-O-sulfatación de GlcNS y GlcNS6S	Shworak <i>et al.</i> , 1999; Lawrence <i>et al.</i> , 2007
HS 3-sulfotransferasa 5 (H3OST-5)	<i>HS3ST5</i> (AF503292)	3-O-sulfatación de GlcN, GlcNS GlcNS6S	Xia <i>et al.</i> , 2002
HS 3-sulfotransferasa 6 (H3OST-6)	<i>HS3ST6</i> (NM_001009606)	3-O-sulfatación de GlcNS y GlcNS6S	Xu <i>et al.</i> , 2005

<sup>[a]</sup> Se indica el nombre oficial del gen humano y su número de acceso en el GenBank<sup>TM</sup> (entre paréntesis).

<sup>[b]</sup> Las referencias citadas describen la clonación de proteínas de ratón. Para GLCE, H2OST y H6OST-3, los números de acceso a las secuencias de ratón son AF325532, AF060178 y NM\_015820. Las proteínas humanas no se encuentran clonadas, pero las secuencia están descritas en Crawford *et al.*, 2001 (basados en secuencias depositadas por Nagase *et al.*, 1998); Seki *et al.*, 1997 y Bonner *et al.*, 2002,<sup>[14]</sup> respectivamente.

<sup>[c]</sup> La actividad sulfotransferasa frente a residuos de GlcNAc sólo está demostrada en ratones (Zhang *et al.*, 2001; Habuchi *et al.*, 2003). Para las proteínas humanas, esta actividad sólo se ha detectado al nivel de trazas (Habuchi *et al.*, 2003).

<sup>[14]</sup> Bonner, T.I.; Ferraren, D. O. y Detera-Wadleigh, S. (2002) «The coding sequence of HS6ST3 spans an intron of 741 kb», artículo no publicado. Secuencia enviada directamente a GenBank<sup>TM</sup> el 19 de agosto de 2002.



enzimas diferentes, HS GlcA epimerasa (GLCE) y HS 2-sulfotransferasa (H2OST). Para ambas proteínas las formas humanas no se encuentran clonadas, aunque sí las de ratón (Kobayashi *et al.*, 1997; Crawford *et al.*, 2001).

Las últimas modificaciones que se dan son las 3-O- y 6-O-sulfataciones de GlcN, catalizadas por una HS 6-sulfotransferasa (H6OST) y una HS 3-sulfotransferasa (H3OST), respectivamente. De ambas enzimas se conocen varias isoformas, tres para H6OST (Habuchi *et al.*, 1998, 2000, 2003) y siete para H3OST (Shworak *et al.*, 1997, 1999; Xia *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2007).

### **Las modificaciones en el tetrasacárido conector**

No se conoce cómo ni qué enzimas realizan las modificaciones del tetrasacárido conector, aunque se ha señalado que una condroitina 6-sulfotransferasa podría ser la encargada de realizar la 6-O-sulfatación en la Gal-2.<sup>[15]</sup>

Se sabe que la fosforilación de la Xyl se da después la primera reacción de galactosilación y antes de la acción de GlcAT-I; durante la glucuronización se produce la desfosforilación de forma masiva (Moses *et al.*, 1997a, 1999), aunque no todos los residuos se desfosforilan, ya que se han encontrado HS maduros con 2-O-P (Sugahara *et al.*, 1988; Moses *et al.*, 1999).

No se conoce en qué momento se realizan las sulfataciones de los residuos de Gal. En todo caso, debido a que la 6-O-S y 4-O-S de Gal-3 inhiben a GlcAT-I (Gulberti *et al.*, 2005; Tone *et al.*, 2008), y ya que se han encontrado estructuras GlcA–Gal6S–Gal6S–Xyl–O–Ser en PG maduros (de Waard *et al.*, 1992) deberían darse después de la glucuronosilación. Por otro lado, la 6-O-S de la Gal-2 podría darse antes, ya que aumenta la afinidad de GlcAT-I por el tetrasacárido conector (Gulberti *et al.*, 2005; Tone *et al.*, 2008).

### **¿Cómo discrimina la célula entre C/DS y HS?**

El hecho de que las cadenas de HS y C/DS se encuentren unidas a las proteínas núcleo mediante la misma estructura, el tetrasacárido conector, encierra una pregunta que a día de hoy permanece sin respuesta. ¿Cómo es capaz de diferenciar la

<sup>[15]</sup> Kitagawa, H.; Tsutsumi, K.; Ikegami, A.; Goto, F.; Ogawa, T. y Sugahara, K.; datos sin publicar. Citado en Tone *et al.* (2008).

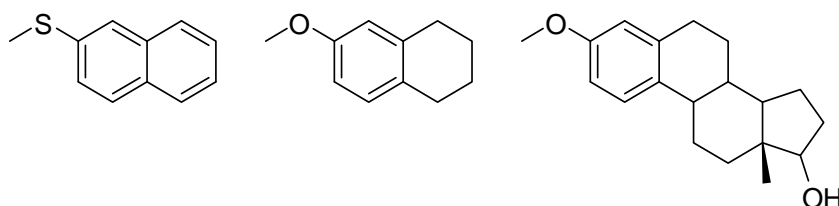
maquinaria biosintética sobre qué proteínas construir cadenas de HS y sobre cuáles C/DS?

Desde finales de los setenta se han sucedido una serie de hipótesis a este respecto. Algunas, como la compartimentación enzimática (Uhlén-Hansen y Yanagishita, 1993) se encuentran desechadas en la actualidad (Kjellén y Lindahl, 1991; Fritz *et al.*, 1997; Fransson *et al.*, 2000). Otras, las que se explican a continuación, siguen siendo objeto de debate.

### **La proteína núcleo contiene secuencias que determinan la formación de HS o CS**

Como se ha mencionado anteriormente, es conocido el hecho de que los  $\beta$ -D-xilopiranosidos pueden ser utilizados como cebadores de la biosíntesis de GAG al actuar como sustratos de GalT-I. Normalmente estos xilopiranosidos dirigen la biosíntesis de GAG artificiales hacia la formación de cadenas de C/DS y sólo de forma marginal se produce la formación de cadenas de HS (Johnston y Keller, 1979; Robinson y Lindahl, 1981; Sobue *et al.*, 1987; Lugemwa y Esko, 1991; Fritz *et al.*, 1994a). Incluso en células que sólo producen cadenas HS de forma natural, el uso de xilósidos induce la formación preferencial de C/DS (Robinson y Lindahl, 1981; Stevens y Austen, 1982; Iozzo y Hassell, 1989).

No obstante, es posible favorecer la formación de HS utilizando xilopiranosidos con aglicones aromáticos y heterocíclicos (**Figura 15**), como el estradiol, el naftol o el metilumbelifenol (Johnston y Keller, 1979; Lugemwa y Esko, 1991; Fritz *et al.*, 1994a). En la **Tabla 9** se muestran algunos xilopiranosidos que han sido utilizados como cebadores de la síntesis artificial de GAG. Si los compuestos pudieron cebar la síntesis de HS, se indica su porcentaje en la cantidad total de GAG excretados al medio extracelular. Aunque el porcentaje final de HS generados artificialmente



**Figura 15.** Algunos aglicones que dirigen la biosíntesis de GAG hacia la formación de HS.

depende de varios factores como puede ser la concentración de los xilopiranósidos en el medio (Schwartz *et al.*, 1974a) y el interior celular (Sobue *et al.*, 1987), es únicamente la estructura del aglicón la que determinará si se producirán, o no, HS.

También es conocido que determinadas estructuras de la proteína núcleo favorecen la formación de HS frente a C/DS. La presencia de aminoácidos aromáticos, como Trp, Tyr y Phe, cercanos a la secuencia de glicosilación SGD favorece la formación de HS en dichos sitios (Zhang y Esko, 1994; Zhang *et al.*, 1995). A este respecto, se piensa que los aglicones con estructuras aromáticas de los

**Tabla 9.** Algunos xilopiranósidos utilizados como cebadores de la biosíntesis de GAG.

Compuesto	% HS <sup>[a]</sup>	Tipo celular <sup>[b]</sup>	Referencia
$\beta$ -D-Xyl	n. d.	-	Helting y Rodén, 1969
Metil $\beta$ -D-Xyl	n. d. 0	- CHO <i>pgsA</i> -745	Helting y Rodén, 1969 Lugemwa y Esko, 1991
4-Metilumbeliferil O- $\beta$ -D-Xyl	n. d. 14	- CHO <i>pgsA</i> -745	Okayama y Lowther, 1973 Lugemwa y Esko, 1991
<i>p</i> -Nitrofenil O- $\beta$ -D-Xyl	n.d 13 6	- SV3T3 CHO <i>pgsA</i> -745	Okayama <i>et al.</i> , 1973 Johnston y Keller, 1979 Lugemwa y Esko, 1991
Etil O- $\beta$ -D-Xyl	n. d.	-	Robinson <i>et al.</i> , 1975
<i>n</i> -Butil O- $\beta$ -D-Xyl	n. d.	-	Robinson <i>et al.</i> , 1975
<i>n</i> -Octil O- $\beta$ -D-Xyl	n. d. 6	- CHO <i>pgsA</i> -745	Robinson <i>et al.</i> , 1975 Lugemwa y Esko, 1991
Bencil O- $\beta$ -D-Xyl	n. d.	-	Robinson <i>et al.</i> , 1975
Fenil O- $\beta$ -D-Xyl	n. d.	-	Robinson <i>et al.</i> , 1975
Fenilamina <i>N</i> - $\beta$ , $\alpha$ -D-Xyl	n. d.	-	Sobue <i>et al.</i> , 1987
<i>p</i> -Carboxifenil O- $\beta$ -D-Xyl	n. d.	-	Sobue <i>et al.</i> , 1987
Alquil S- $\beta$ -D-tio-Xyl <sup>[c]</sup>	n. d.	-	Sobue <i>et al.</i> , 1987
$\beta$ -Estradiol O- $\beta$ -D-Xyl	45	CHO <i>pgsA</i> -745	Lugemwa y Esko, 1991
<i>trans</i> , <i>trans</i> Farnesil O- $\beta$ -D-Xyl	0	CHO <i>pgsA</i> -745	Lugemwa y Esko, 1991
Colesteril O- $\beta$ -D-Xyl	0	CHO <i>pgsA</i> -745	Lugemwa y Esko, 1991
2-Naftil O- $\beta$ -D-Xyl	32	CHO <i>pgsA</i> -745	Fritz <i>et al.</i> , 1994a
5-Hidroxiindol O- $\beta$ -D-Xyl	14	CHO <i>pgsA</i> -745	Fritz <i>et al.</i> , 1994a
3-d-Equileninil O- $\beta$ -D-Xyl	55	CHO <i>pgsA</i> -745	Fritz <i>et al.</i> , 1994a
9-Fenantril O- $\beta$ -D-Xyl	20	CHO <i>pgsA</i> -745	Fritz <i>et al.</i> , 1994a

<sup>[a]</sup> Se indica si el xilósido fue capaz de iniciar la síntesis de HS.

<sup>[b]</sup> Indica el tipo celular utilizado en los ensayos de síntesis de GAG.

<sup>[c]</sup> Probaron diferentes longitudes de alquilo (Xyl-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>) desde n = 0 (metilo) hasta 10.

xilopiranosidos que ceban la síntesis de HS, es debido a que pueden mimetizar estas zonas de la proteína núcleo (Fritz *et al.*, 1994a).

Las cajas ácidas son unas secuencias de la proteína núcleo ricas en residuos ácidos que flanquean la secuencia SGD (Esko y Zhang, 1996; Wilson, 2004; Whitelock e Iozzo, 2005). Estas secuencias amplifican la posibilidad de que se genere una cadena de GAG en la secuencia SGD cercana. Algunas de estas secuencias favorecen la formación de cadenas de HS, mientras que otras favorecen la formación de C/DS (Zhang y Esko, 1994; Zhang *et al.*, 1995).

Así, tanto la formación de CS como la de HS, se ve afectada por la presencia/ausencia de determinadas secuencias y estructuras en la proteína núcleo (Whitelock e Iozzo, 2005). En el caso de los primeros el glicosoma necesita de menos elementos estructurales para reconocer la secuencia consenso y poder polimerizar el GAG (Nadanaka *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003; Kitagawa *et al.*, 2003), por eso la síntesis de C/DS se ve favorecida «por defecto». Aunque estas secuencias favorezcan la síntesis de cadenas de HS, su presencia no es una condición *sine qua non*. Muchos PG como la serglicina, el sindecano o el colágeno XVIII pueden estar decorados, en el mismo sitio, con CS o HS dependiendo del tipo celular y las condiciones del cultivo (Yurt *et al.*, 1977; Enerbäck *et al.*, 1985; Seldin *et al.*, 1985; Rapraeger, 1989; Dong *et al.*, 2003), lo que implica que la información de HS vs CS no se encuentra exclusivamente en la proteína núcleo.

### ***Las modificaciones del tetrasacárido conector***

Como se ha comentado anteriormente, la sulfatación en O-6 de Gal-2 y Gal-3, y en O-4 de Gal-3 sólo se da en las cadenas de CS, mientras que la 2-O-fosforilación en la Xyl aparece en HS y CS (Sugahara *et al.*, 1988, 1992a, 1992b, 1995; de Waard *et al.*, 1992). Debido a estas diferencias, muchos autores han propuesto que las sulfataciones en los residuos de Gal podrían ser señales que facilitasen la síntesis de CS y/o bloqueasen la de HS (Salimath *et al.*, 1995; Sugahara y Kitagawa, 2000, 2002; Ueno *et al.*, 2001).

Estas afirmaciones se basan en el hecho de que las modificaciones afectan a algunas enzimas biosintéticas: GlcAT-I aumenta su eficiencia catalítica frente a estructuras que contienen grupos 2-O-P en la Xyl y 6-O-S en la Gal-2, mientras que las 4-O-S y 6-O-S de la Gal-3 bloquean su actividad enzimática (Gulberti *et al.*, 2005;

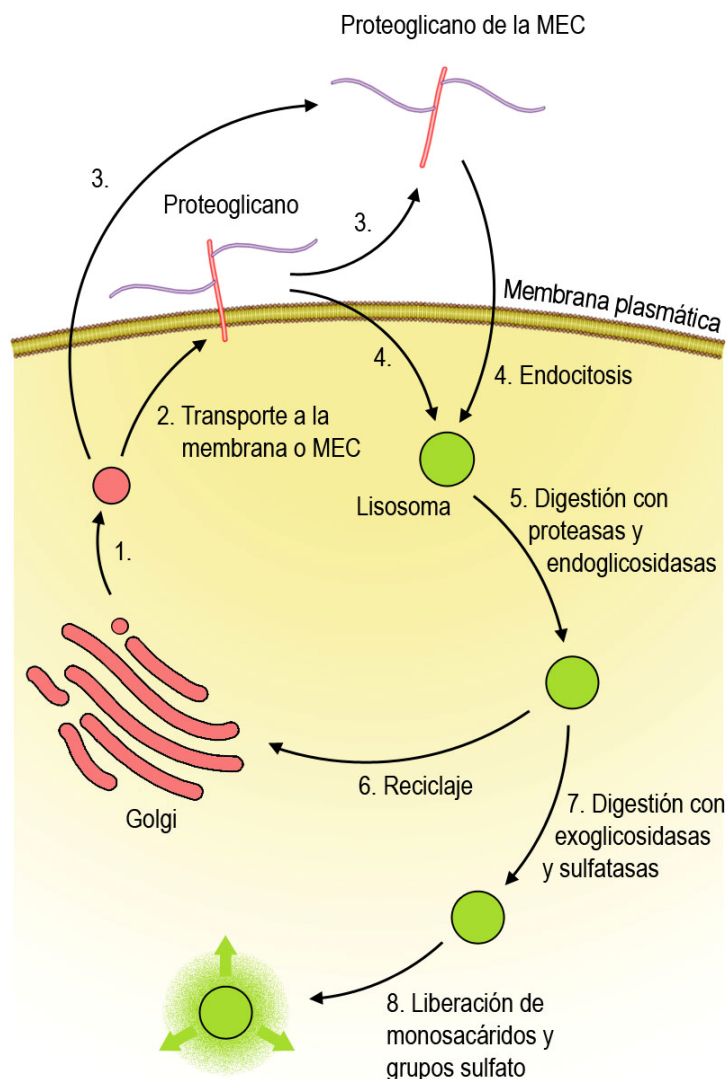
Tone *et al.*, 2008). La 2-O-P también inhibe a GalT-I (Gulberti *et al.*, 2005). Podrían ser, pues, mecanismos de control (Moses *et al.*, 1997a, 1999) semejantes a los existentes en otros puntos de la biosíntesis: por ejemplo, la 4,6-bisulfatación de las CS supone *de facto* la terminación de las cadenas, ya que dichas modificaciones inhiben la actividad  $\beta$ -GalNAcT-II de ChSy (Kitagawa *et al.*, 1995; Fransson *et al.*, 2000), mientras que CSGalNAc-T2 se ve favorecida por la presencia de grupos sulfato en las cadenas durante el proceso de elongación (Sato *et al.*, 2003).

Una modificación inusual consiste en la adición de un residuo de  $\alpha$ -GalNAc unido al GlcA del tetrasacárido conector (Salimath *et al.*, 1995). Esta modificación podría ser un marcador para la síntesis de HS (Fransson *et al.*, 2000). Como EXTL2 posee actividad  $\alpha$ -GalNAcT (Kitagawa *et al.*, 1999), existe la posibilidad de que esta proteína «marcase» los tetrasacáridos sobre los que se van a sintetizar cadenas de HS con el residuo de  $\alpha$ -GalNAc. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que la actividad  $\alpha$ -GalNAcT se inhibe con la 4-O-S de Gal-3 (Kitagawa *et al.*, 1995; Lidholt *et al.*, 1997).

## Metabolismo y degradación de los proteoglicanos

El metabolismo de los PG se encuentra, normalmente, en un estado estacionario; la síntesis y la degradación son procesos igual de rápidos que mantienen un fondo constante de PG anclados a la superficie celular y en el MEC (Yanagishita y Hascall, 1992, Edgren *et al.*, 1997), tal y como aparece ilustrado en la **Figura 16**. La vida media del PG depende de su naturaleza y del tipo celular, pudiendo ser horas (Lark y Culp, 1984; Iozzo, 1987; Egeberg *et al.*, 2001) o semanas (Rodríguez S. y Gómez T., 2003).

La degradación de los PG puede variar entre diferentes tipos celulares, especies o, simplemente, entre distintos tipos de PG (Yanagishita, 1992) y comienza cuando los PG son tomados del exterior e interiorizados por las células mediante endocitosis. En los endosomas, las proteínas núcleo son degradadas por proteasas lisosomales, mientras que las cadenas de GAG son parcialmente degradadas por endo- $\beta$ -glicosidasas específicas, dando lugar a aminoácidos y cadenas de GAG de entre 5 y 10 kDa (Yanagishita y Hascall, 1992; Prabhakar y Sasisekharan, 2006). Las enzimas humanas conocidas que participan en esta ruta aparecen recogidas en la **Tabla 10**.



**Figura 16.** Esquema general del metabolismo de los proteoglicanos. Después de ser sintetizados en el aparato de Golgi, los PG entran en el sistema vacuolar hasta su destino (1). Los PG son transportados hacia la membrana plasmática, donde permanecen anclados (2) o son liberados a la MEC (3). Mediante endocitosis, la célula capta los PG del exterior (4). En los endosomas se inicia su digestión: en un primer paso actúan proteasas y endoglicosidasas, que digieren las proteínas núcleo y cortan las cadenas de GAG, respectivamente (5). Parte de estos fragmentos pueden ser redirigidos hacia Golgi, donde son reciclados en la síntesis de nuevos PG (6). El endosoma evoluciona formándose el lisosoma, donde las cadenas de GAG son degradadas mediante exoglicosidasas y sulfatasas a monosacáridos y grupos fosfato (7). Estos compuestos básicos son finalmente liberados al citoplasma para su uso en otras rutas metabólicas (8).

En un paso posterior, ya en los lisosomas, los oligosacáridos que no hayan sido reciclados (Takeuchi *et al.*, 1990, Edgren *et al.*, 1997) son degradados por sulfatasas y exoglicosidasas específicas (**Tabla 10**) en un proceso secuencial y ordenado. Como

**Tabla 10.** Genes y proteínas implicados en el catabolismo de proteoglicanos.

Proteína	Gen <sup>[a]</sup>	Actividad biosintética	Referencias
Hialuronidasa 2	<i>HYAL2</i> (AJ000099)	Endo <i>N</i> -acetil-galactosaminidasa: rotura de las cadenas de C/DS	Lepperdinger <i>et al.</i> , 1998
Hialuronidasa 4	<i>HYAL4</i> (AF009010)	Endo <i>N</i> -acetil-galactosaminidasa: rotura de las cadenas de C/DS	Csóka <i>et al.</i> , 1999
Iduronato 2-sulfatasa	<i>IDS</i> (M58342)	Hidrólisis del grupo sulfato de IdoA2S en HS y DS	Wilson <i>et al.</i> , 1990
$\alpha$ -L-Iduronidasa	<i>IDUA</i> (M74715)	Eliminación del IdoA terminal en HS y DS	Scott <i>et al.</i> , 1991
<i>N</i> -sulfoglucosamina sulfohidrolasa (Heparano <i>N</i> -sulfatasa)	<i>SGSH</i> (BC047318)	Hidrólisis del grupo <i>N</i> -S de GlcNS	Scott <i>et al.</i> , 1995
Acetil-CoA <i>N</i> -acetiltransferasa	<i>HGSNAT</i> (XM_372038)	Acetilación de GlcNH del extremo no reductor	Fan <i>et al.</i> , 2006 Hřebíček <i>et al.</i> , 2006
$\alpha$ - <i>N</i> -Acetil-glucosaminidasa	<i>NAGLU</i> (NM_000263)	Hidrólisis de GalNAc del extremo no reductor	Webber <i>et al.</i> , 1996 Zhao <i>et al.</i> , 1996
GlcNAc 6-sulfatasa	<i>GNS</i> (NM_002076)	Hidrólisis del grupo sulfato de GlcNAc6S en HS y KS	Robertson <i>et al.</i> , 1992
Arilsulfatasa B (GalNAc-4-sulfatasa)	<i>ARSB</i> (M32373)	Hidrólisis del grupo sulfato de GalNAc4S en CS y DS	Peters <i>et al.</i> , 1990; Schuchman <i>et al.</i> , 1990
GalNAc 6-sulfatasa	<i>GALNS</i> (D17629)	Hidrólisis del grupo sulfato de GalNAc6S en CS y KS	Tomatsu <i>et al.</i> , 1991; Morris <i>et al.</i> , 1994
$\beta$ - <i>N</i> -Acetil-hexosaminidasa <sup>[b]</sup>	<i>HEXA</i> (S62076) <i>HEXB</i> (BT009919)	Eliminación de GalNAc4S y GalNAc del extremo no reductor	Korneluk <i>et al.</i> , 1986; Neote <i>et al.</i> , 1988
$\beta$ -Glucuronidasa	<i>GUSB</i> (M15182)	Eliminación de GlcA del extremo no reductor en HS y C/DS	Oshima <i>et al.</i> , 1987

<sup>[a]</sup> Se indica el nombre oficial del gen humano y su número de acceso al GenBank™ (entre paréntesis).

<sup>[b]</sup> Las hexosaminidasas A y B están formadas por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , codificadas respectivamente por *HEXA* (Korneluk *et al.*, 1986) y *HEXB* (Neote *et al.*, 1988).

las exoglicosidasas no pueden eliminar monosacáridos modificados, las sulfatasas eliminan antes los grupos sulfato. Por ejemplo, la iduronato 2-sulfatasa (Wilson *et al.*, 1990) elimina el grupo 2-O-sulfato de los residuos de IdoA, que son posteriormente hidrolizados por la  $\alpha$ -L-iduronidasa (Scott *et al.*, 1991). La única excepción es la hexosaminidasa A, que puede hidrolizar directamente un residuo de GalNAc4S de las cadenas de CS (Prabhakar y Sasisekharan, 2006). Para eliminar los residuos de GlcN de las cadenas de HS es necesario un paso previo de *N*-acetilación, que es realizada por una AcCoA *N*-acetiltransferasa (Fan *et al.*, 2006; Hřebíček *et al.*, 2006). Después,

**Tabla 11.** Enfermedades asociadas a deficiencias en las enzimas catabólicas de HS y C/DS.

Enfermedad	Deficiencia enzimática	Síntomas
MPS tipo I (Síndrome de Hurler/Scheie)	$\alpha$ -L-Iduronidasa	Organomegalia, córneas opacas, sordera, enfermedades coronarias, retraso mental, muerte infantil.
MPS tipo II (Síndrome de Hunter)	Iduronato 2-sulfatasa	Hiperactividad, conducta agresiva, retraso mental, deterioro mental, esplasticidad, muerte en la adolescencia.
MPS tipo IIIA (Síndrome de Sanfilippo A)	Heparano N-sulfatasa	Deterioro mental profundo, retraso mental, rigidez articular, problemas de comportamiento.
MPS tipo IIIB (Síndrome de Sanfilippo B)	$\alpha$ -N-Acetilglucosaminidasa	Síntomas similares a IIIA, pero generalmente más suaves.
MPS tipo IIIC (Síndrome de Sanfilippo C)	Acetil CoA N-acetiltransferasa	Síntomas similares a IIIA, pero generalmente más suaves.
MPS tipo IIID (Síndrome de Sanfilippo D)	GlcNAc 6-sulfatasa	Síntomas similares a IIIA, pero generalmente más suaves.
MPS tipo IVA (Síndrome de Morquio A)	GalNAc 6-sulfatasa	Desarrollo óseo anormal, articulaciones hipermóviles, córneas opacas, macrocefalia, baja estatura, dientes espaciados.
MPS tipo VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)	GalNAc 4-sulfatasa	Córneas opacas, sordera, endurecimiento de la <i>dura mater</i> .
MPS tipo VII (Síndrome de Sly)	$\beta$ -Glucuronidasa	<i>Hydrops fetalis</i> (retención de líquidos), retraso mental leve, hidrocefalia, córneas opacas.
Gangliosidosis G <sub>M2</sub>	$\beta$ -Hexosaminidasa	Muerte infantil, atrofia muscular neurodegeneración, pérdida de visión y audición, retraso mental.
DMS (mucosulfatidosis)	Factor de modificación de sulfatasas 1	Degeneración neuronal y nerviosa, problemas de desarrollo, muerte infantil.

la  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa hidroliza el monosacárido (Webber *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1996).

La mayoría de las sulfatasas y exo-glicosidasas se producen como pro-proteínas que son procesadas en los lisosomas para generar las formas activas (Clements *et al.*, 1989; Bielicki *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1991 Webber *et al.*, 1996). Estas enzimas se encuentran moduladas por la estructura de los grupos vecinos y sufren inhibición por exceso de producto, por lo que se ha especulado que podrían formar un complejo multienzimático (Bielicki *et al.*, 1990).



Cuando el proceso se ha completado, los monosacáridos, los grupos sulfato, los aminoácidos y los dipéptidos resultantes de la digestión de las proteínas núcleo son liberados al citosol a través de transportadores específicos y/o por mecanismos de difusión pasiva (Winchester, 2005; Freeze, 2009).

La importancia metabólica de las rutas de degradación de GAG se manifiesta con la cantidad de enfermedades que están ligadas al malfuncionamiento de las enzimas propias de estas rutas (**Tabla 11**). La más importante es la mucopolisacaridosis (MPS), una enfermedad autosómica recesiva<sup>[16]</sup> caracterizada por la acumulación de GAG en los lisosomas (Neufeld y Muenzer, 1995).

## **Segunda parte: los $\beta$ -D-xilopiranosidos pueden inhibir el crecimiento celular: xilopiranosidos como anticancerígenos**

Ya que una parte importante del control del crecimiento celular recae sobre los PG (Esko *et al.*, 2009), no es de extrañar que el metabolismo de éstos sea determinante para muchos procesos relacionados con el cáncer, como son la angiogénesis, la progresión tumoral y la metástasis (Sasisekhara *et al.*, 2002), algunos de los cuales aparecen recogidos en la **Tabla 12**.

Al interaccionar con factores de crecimiento y morfógenos de la MEC y controlar el crecimiento celular, los PG son un buen blanco en estrategias antiproliferantes. Además, en ocasiones se ha observado que los patrones de PG cambian entre las células normales y las transformadas. En este sentido, los glipicanos están muy relacionados con el crecimiento tumoral; su expresión ectópica está relacionada con comportamientos invasivos (Liu *et al.*, 1998) al actuar como promotores de la metástasis (Liu *et al.*, 2002). Por tanto, la tumorogénesis puede reducirse al transfectar las células con cDNA antisentido para el glipicano 1 (Kleeff *et al.*, 1999).

El bloqueo de la acción de las heparanasas, por ejemplo, es una aproximación utilizada en el tratamiento del cáncer. El crecimiento de las líneas celulares cancerígenas puede detenerse inhibiendo las heparanasas extra e intracelulares con pequeños oligosacáridos sulfatados (Irimura *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1990; Miao *et al.*, 1999; Parish *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002) o con miméticos de la heparina (Takahashi

---

<sup>[16]</sup> La única excepción es la MPS de tipo II, que está ligada al cromosoma X (Neufeld y Muenzer, 1995)

**Tabla 12.** Proteínas que interaccionan con GAG, los efectos biológicos resultado de la interacción y la relación de estos con el cáncer (tomada de Sasisekharan *et al.*, 2002)

Proceso biológico	Proteína/factor	Efecto biológico	Efecto sobre el cáncer
Coagulación	<i>Antitrombina III</i>	<i>Cambio conformacional</i>	<i>Inhibición de la formación del esqueleto de fibrina</i>
	<i>Trombina</i>	<i>Formación del complejo ternario</i>	<i>Modulación de la cascada de coagulación</i>
Factores de crecimiento y morfógenos	FGF	Oligomerización del receptor	Activación autocrina del crecimiento
	HGF	Secuestro de factores de crecimiento	Promueve el crecimiento del tumor
	WNT	Formación del gradiente	Difusión de morfógenos y regulación de la diferenciación
Factores angiogénicos	<i>Endostatina</i>	<i>Receptor</i>	<i>Inducción de la angiogénesis</i>
	<i>VEGF</i>	<i>Señalización</i>	<i>Inducción de la angiogénesis</i>
Citoquinas y quimioquinas	Interluquinas	Secuestro de FC	Modulación de la respuesta inmune antitumoral
	MIP-1 $\beta$	Formación del gradiente de quimioquinas	Modulación de la respuesta inmune antitumoral
<i>Interacción célula-célula</i>	<i>Selectina P</i>	<i>Modulación de interacciones entre el tumor y las plaquetas</i>	<i>Mecanismo por el que los GAG promueven la metástasis</i>
Interacciones célula-MEC	Laminina, fibronectina	Adhesión a la MEC	Inhibición del crecimiento tumoral y diferenciación
<i>Enzimas</i>	<i>Heparanasa</i>	<i>Degradación de la MEC</i>	<i>Barrera antimetastática, secuestro de factores que promueven la invasividad</i>

FC, factor de crecimiento; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; MIP-1 $\beta$ , proteína de macrófago inflamatorio 1 $\beta$ ; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular

*et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2004). La inhibición de las heparanasas impide la rotura de la pared de polisacáridos que precede a la metástasis y bloquea la liberación de factores proangiogénicos como FGF2 (Sasisekharan *et al.*, 2002).

La interferencia en el metabolismo de los GAG se ha probado también en estrategias combinadas con otros agentes antitumorales, como la  $\alpha$ -difluorometil ornitina (DFMO), que bloquea la captación y síntesis de poliaminas. Se ha visto que las células deficientes en la biosíntesis de PGHS son más sensibles al tratamiento con DFMO como antitumorales. Así mismo, en ratones tratados con DMFO y un xilopiranósido que bloquea la biosíntesis de HS endógenos, la tumorigenia es menor que en ratones tratados solamente con DMFO (Belting *et al.*, 2002).

Estos xilopiranósidos pueden actuar, además, como anticancerígenos y/o antiproliferantes por sí mismos. El uso de xilopiranósidos como herramientas en el estudio de los PG ha sido muy común (Gibson *et al.*, 1978; Kinoshita y Saiga, 1979; Spooncer *et al.*, 1983; Sobue *et al.*, 1987; Kolset *et al.*, 1990; Gulberti *et al.*, 2005), pero además, estos compuestos han permitido el desarrollo de compuestos bioactivos que han demostrado su utilidad como activadores de FGF (Miao *et al.*, 1995), antitrombóticos (Martin *et al.*, 1996; Kisilevsky *et al.*, 2004) e inhibidores del crecimiento de células transformadas, esto es, anticancerígenos (Mani *et al.*, 1998, Belting *et al.*, 2002; Mani *et al.*, 2004).

Johnston y Keller observaron que al tratar con  $\beta$ -D-xilopiranósidos células transformadas (SV3T3), disminuía su tasa de proliferación. Los autores establecieron la hipótesis de que, ya que las células transformadas y las normales presentaban diferentes patrones en los HS de sus superficies celulares, la modificación del metabolismo de estos compuestos podría tener efectos diferentes en según qué líneas celulares (Johnston y Keller, 1979). Muchas de las funciones celulares dependen de la correcta interacción entre los PG de la superficie y las moléculas del entorno celular, como factores de crecimiento y poliamidas (Belting *et al.*, 2002). Esto provoca que cualquier mal funcionamiento en el metabolismo de los PG pueda llevar a alteraciones graves en el desarrollo celular e incluso a la muerte (Kolset *et al.*, 1990).

En la misma línea, Kolset *et al.* (1990) observaron que se podía inhibir la proliferación celular en presencia de *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-xilopiranósido y hexil  $\beta$ -D-tioxilopiranósido. Esta actividad antiproliferante se asoció con el malfuncionamiento que los xilósidos causaban en el metabolismo de PGCS, aunque otros compuestos que eran capaces de interferir en la biosíntesis de PG (Robinson y Robinson, 1981) se mostraron inactivos como antiproliferantes.

Mani *et al.* encontraron que el 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido era un potente antitumoral (Mani *et al.*, 1998) y el tratamiento con ese xilósido de ratones con tumores inducidos artificialmente reducía la carga tumoral entre el 70-97 % (Mani *et al.*, 2004). Este efecto antiproliferante variaba dramáticamente dependiendo de la estructura fina del aglicón (Mani *et al.*, 1998; Mani *et al.*, 2004; Jacobson *et al.*, 2006; Johnsson *et al.*, 2007) y no estaba causado por el xilósido en sí, sino por los HS cuya síntesis había cebado.

La capacidad de los xilopiranósidos para cebar la biosíntesis de cadenas de HS (y, por tanto, para actuar como posibles anticancerígenos) podría estar relacionada con su capacidad para actuar como aceptores de B4GALT7. En este sentido, el desarrollar nuevos xilopiranósidos con aglicones hidrófobos puede conducir a una nueva familia de agentes antitumorales que actuaría como «aceptores trampa» de la B4GALT7, de tal suerte que puedan modificar el metabolismo de los PG de las células tumorales. En este contexto es en el que se articula el trabajo realizado en la presente memoria.

## **Capítulo 3: objetivos**



Los objetivos del trabajo que recoge esta memoria pueden resumirse en:

1. Diseño y optimización de un método sencillo de subclonación, sobreexpresión y purificación de la enzima humana  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa 7 en *Escherichia coli*.
2. Caracterización cinética y estructural de la enzima B4GALT7 recombinante, obtenida como proteína de fusión a una cola de polihistidinas.
3. Desarrollo de una estrategia sintética eficaz de 3-amidopropil xilopiranosidos, de forma que un esquema de síntesis general permita la obtención de una amplia batería de estructuras en los aglicones de los xilopiranosidos.
4. Síntesis, purificación y caracterización estructural del glicoaminoácido O-xilopiranosil-L-serina.
5. Estudio de la actividad de los xilopiranosidos sintetizados frente a la B4GALT7 recombinante y su caracterización como «aceptores trampa» de la enzima.
6. Estudio de la capacidad antiproliferante de los xilopiranosidos sintetizados en cultivos celulares.





## **Capítulo 4: materiales y métodos**



## **Primera Parte: obtención y caracterización de la enzima $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa 7 humana**

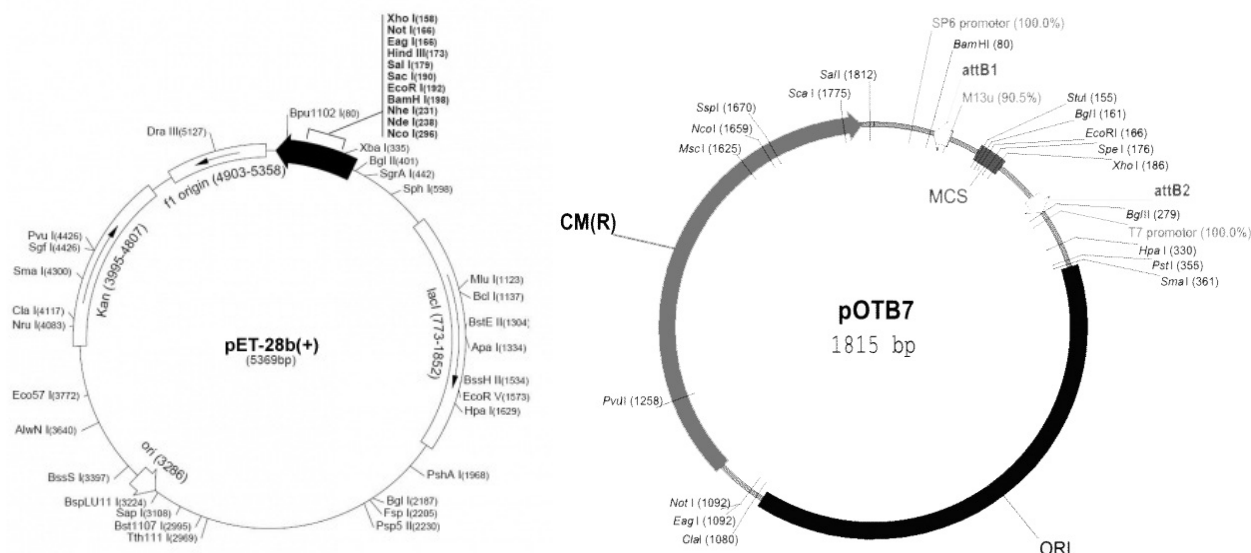
### ***Materiales***

En la realización del trabajo presentado en esta memoria se han utilizado las siguientes cepas de *Escherichia coli*: BL21 (DE3) (Promega), DH5 $\alpha$  (Promega), K12 (ATCC 86984) e IRALp962B203Q2 (RZPD Clone Library).

El plásmido pET-28b(+) fue adquirido a Novagen (**Figura 17**).

La T4-DNA polimerasa, las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *NheI*, *PstI* y los patrones de peso molecular *1 kb DNA Ladder* fueron adquiridos a MBI Fermentas.

Los fragmentos de ADN fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa D1-Medium EEO (Pronadisa). Los geles fueron resueltos utilizando una cubeta *Run One<sup>TM</sup> Electrophoresis Cell* de EmbiTec.



**Figura 17.** Esquema del plásmido pET-28b(+) (izqda.) y del pOTB7 (dcha.). El plásmido pEB203Q2, suministrado por RZPD Clone Library, está construido clonando el cDNA codificante para B4GALT7 entre las dianas de *EcoRI* y *XhoI* del sitio de policlonaje (MCS) del vector pOTB7.

Para la purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el kit *Perfectprep® Gel Cleanup* de Eppendorf. Para la purificación de plásmidos a partir de cultivos bacterianos se utilizó el kit *Genelute™ Plasmid Miniprep* de Sigma.

Para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se utilizó el sistema *MiniProtein® 3* de Bio-Rad. Los geles se prepararon utilizando una disolución comercial (Bio-Rad) de acrilamida/bis-acrilamida al 30% (29:1) y se les añadió 2,2,2-tricloro-etanol para su visualización mediante radiación UV (Ladner *et al.*, 2004). Además, se tiñeron utilizando los procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El patrón de pesos moleculares *Low Molecular Weight Calibration Kit* se obtuvo en GE Healthcare.

Los análisis densitométricos de los geles de agarosa y acrilamida/bisacrilamida se realizaron utilizando un fotodocumentador *Gene Flash Bio Imaging* de Syngene Ltd. con el software Gene Tools 3.07.

Las enzimas PK y LDH fueron adquiridas en Sigma-Aldrich. La lisozima fue suministrada por USB Corporation y la DNasa I por Roche. El IPTG y el imidazol fueron adquiridos en Acros Organics. El sulfato de estreptomicina, el sulfato de kanamicina, el cloranfenicol, el ATP, el NADH y el resto de reactivos de rutina

utilizados en el trabajo de la presente memoria fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y Scarlab.

Los componentes para la preparación de medio de cultivo Luria-Bertani (extracto de levadura y triptona) fueron suministrados por Pronadisa. Los cultivos celulares se incubaron en un agitador orbital termostatzado *Lab-Shaker* de Adolf Kühner AG.

Para obtención de extractos libres de células (CFE) se utilizó una prensa francesa de Thermo Electron Corp.

La resina de  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA-agarosa (35-40  $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{mL}$  de resina) fue suministrada por Agarose Bed Technologies (ABT). Las columnas cromatográficas *Glass Econo-Column* ( $\varnothing=2,5$  cm) para la purificación de proteínas se adquirieron a Bio-Rad.

Se utilizaron membranas de diálisis *Spectra/Por*<sup>®</sup> de Spectrum con un tamaño de poro adecuado para proteínas de peso molecular superiores a 12000-14000 Da.

El espectrofotómetro utilizado para medidas de absorbancia y ensayos enzimáticos fue un *UV-Vis SPECTRAMax-384 Plus* de Molecular Devices con el software SofTMax-Pro 5.1.

Para los ensayos en HPLC se utilizaron dos equipos, un HPLC Dionex con un detector de fotodiodo Array PDA-100 (utilizando el software Chromaleon v 6.60) y un HPLC Jasco Pu-2089 Plus con un detector de ultravioleta Jasco UV-2075 Plus (utilizando el software Jasco ChromPass v 1.8.6.1). Se utilizaron dos columnas C18 de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 20 cm de longitud, una *Lichrosorb RP18* (G. L. Science) suministrada por Análisis Vínicos y una *mediterranean sea*<sub>18</sub> suministrada por Teknokroma.

## ***Metodologías generales***

Las técnicas básicas de manipulación de ADN (PCR, clonación, digestión con endonucleasas, transformación, etc.) se realizaron según se describen en Sambrook *et. al.* (1989).

Los fragmentos de ADN se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) con bromuro de etidio (0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

La secuenciación de fragmentos de ADN se realizó en el Centro de Secuenciación de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, usando como cebadores los promotores T7 y SP6.

El análisis de las secuencias clonadas se realizó con los programas FASTA (Pearson y Lipman, 1988) y CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Para el análisis de los fragmentos transmembranal de las proteínas se ha utilizado el programa GREASE (Kyte y Doolittle, 1982).

El análisis de la huella peptídica se realizó en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC.

Los cultivos de cepas de *E. coli* se realizaron en medio LB.

Las disoluciones *stock* de los diferentes xilopiranósidos para los ensayos en células fueron realizadas en H<sub>2</sub>O a concentraciones de 50 mM, excepto para **15** y **17** que se realizaron a la misma concentración en una mezcla DMSO-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v).

Los ensayos de los xilopiranósidos como agentes antiproliferantes se realizaron en el laboratorio de la Dra. Josefina Casas en el Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular del Instituto de Química Avanzada de Cataluña del CSIC.

### ***Subclonación del gen B4GALT7 en el vector pET 28-b(+)***

Para obtener el fragmento de cDNA del gen *B4GALT7* se cultivó el clon IRALp962B203Q2 a 30 °C en medio LB con cloranfenicol (34 µg/mL). De los cultivos se purificó el plásmido p962, el cual se digirió con *EcoRI* y con *PstI* para su caracterización.

El plásmido anterior se digirió con *EcoRI* y *XhoI* en volumen de reacción de 50 µL, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de fragmentos se analizó en un gel de agarosa al 0,8% en TAE. La mezcla de dos fragmentos (indistinguibles uno del otro por electroforesis) se clonó en el vector pET 28-b(+) (5,4 kb), con una relación vector:inserto de 1:3 en un volumen final de 10 µL, utilizando la T4 DNA ligasa y siguiendo instrucciones del fabricante (O/N a 4 °C). La mezcla se utilizó para la transformación de *E. coli* DH5α. Para diferenciar los clones con el plásmido pEcDNA de los que contenían el plásmido pEp962 se realizó una estrategia de doble siembra, en placas con LB-agar con kanamicina (26,3 µg/mL) y con kanamicina-cloranfenicol

(34 µg/mL). Diez clones seleccionados con el plásmido pEcDNA se crecieron en 5 mL de LB para purificar el plásmido y se preservaron a -80 °C. El plásmido fue chequeado mediante análisis de restricción (con *EcoRI*) y por secuenciación.

Para eliminar el fragmento transmembranal, el plásmido pEcDNA se digirió con *NheI* y *PstI* y se trató posteriormente con T4 DNA polimerasa: primero se realizó la digestión en un volumen total de 50 µL y se tuvo 2 h a 37 °C. La reacción se paró por calentamiento durante 20 min a 80 °C. La mezcla se trató directamente con T4 DNA polimerasa y dTTP (90 µM) en un volumen final de 55 µL. Tras 5 min a t. a., se añadió una mezcla de dATP, dGTP, dCTP y dTTP (90 µM). Tras otros 5 min a t. a. se paró la reacción mediante calentamiento a 70 °C durante 10 min.

El plásmido resultante, previa purificación en gel de agarosa, fue tratado con T4 DNA ligasa, añadiendo al medio de reacción PEG 5000, que favorece la unión de los extremos romos (Pheiffer y Zimmerman, 1983). La reacción, con un volumen final de 50 µL, se incubó durante 1 h a 22 °C. Pasado el tiempo, se inactivó la T4 DNA ligasa calentando a 65 °C durante 10 min.

Con la mezcla de ligación se transformó *E. coli* BL21 (DE3), obteniendo así el clon BL/pEb4g7. Cinco de estos clones se crecieron en 5 mL de LB con kanamicina para purificar el plásmido y se preservaron a -80 °C. Los plásmidos se chequearon mediante análisis de restricción con *XhoI* y con *XhoI* + *NcoI* (dos reacciones diferentes en un volumen final de 10 µL) y por secuenciación.

## ***Sobreexpresión y purificación de B4GALT7***

### **Sobreexpresión de B4GALT7**

El cultivo de los clones BL/pEb4g7 se realizó en medio LB con kanamicina (26,3 µg/mL), incubando a 37 °C con agitación. Cuando el cultivo alcanzó una D.O.<sub>600</sub> ~0,5 UA se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. El cultivo se dejó con agitación O/N a 30 °C.

Para obtener un extracto libre de células (CFE), el cultivo bacteriano se centrifugó (10000 x g, 10 min, 4 °C), y el residuo de células fue resuspendido en una mezcla de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (8 mL/g células) con EDTA 50 mM, pH 8,2 (2 mL/g células). El protocolo se realizó según se describe en Bastida *et. al.* (2001) con algunas

modificaciones. Las células se rompieron utilizando una prensa francesa a una presión de 1.100 psi. Después se añadió DNasa I (10 µg/g células) y MgCl<sub>2</sub> (0,95 µg/mL de disolución) y la mezcla se agitó a 4 °C durante 20 min. La mezcla se centrifugó (13000 x g, 30 min, 4 °C) para separar la fracción soluble de proteínas (sobrenadante) de los cuerpos de inclusión (precipitado). Para eliminar los ácidos nucleicos, al sobrenadante se le añadió sulfato de estreptomicina (a una concentración final del 1 %, p/v) y se agitó durante 20 min. Se volvió a centrifugar (13000 x g, 30 min, 4 °C) y se recogió el sobrenadante como CFE.

### **Purificación de B4GALT7**

La proteína se purificó por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando una columna de níquel-agarosa. Un volumen de resina se lavó con 25 volúmenes de Tris-HCl (50 mM; pH 8,0). Se cargó con 10 volúmenes de CFE y posteriormente se lavó con 10 volúmenes de Tris-HCl (50 mM; pH 8,0) y otros 10 volúmenes de Tris-HCl (50 mM; pH 8,0) con imidazol (10 mM). Una vez lavada la columna se procedió a la elución de la proteína pasando 10 volúmenes de Tris-HCl (50 mM; pH 8,0) con imidazol (0,25 M) y otros 10 volúmenes de Tris-HCl (50 mM; pH 8,0) con imidazol (0,5 M). Para eliminar el imidazol, las fracciones puras de B4GALT7 se sometieron a diálisis frente a H<sub>2</sub>O mili-Q realizando un total de 3 cambios cada 2 h.

Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE en geles al 13% en la zona de separación.

### **Caracterización bioquímica de B4GALT7**

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron mediante HPLC o bien por un método multienzimático monitorizado espectrofotométricamente, dependiendo del tipo de compuesto utilizado como sustrato.

Los datos obtenidos, utilizado en uno u otro ensayo, fueron tratados con el módulo SigmaPlot Enzyme Kinetics 1.1 del programa SigmaPlot 8.0.

### **Análisis por HPLC de la actividad galactosiltransferasa**

Para medir la actividad galactosiltransferasa de la proteína se realizó un ensayo según se describe en Higuchi *et al.* (1994) con algunas modificaciones. El medio



estándar de reacción contenía tampón acetato (20 mM; pH 5,0), KCl (50 mM) y  $\text{MnCl}_2$  (20 mM), además de un sustrato aceptor y uno dador de grupos galactosilo (UDP-Gal). El aceptor de referencia utilizado fue el *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-xilopiranosido (*p*-Nph- $\beta$ -D-xyl, 1). La reacción se disparó añadiendo UDP-Gal al medio de reacción, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, parando la reacción por calentamiento a 100 °C durante 5 min. Las muestras se centrifugaron a 16000 x g durante 10 min, recogiendo el sobrenadante libre de proteína.

Los productos de la reacción se separaron mediante HPLC, utilizando una columna C18 (*Lichrosorb RP18*) y una fase móvil de agua con TFA (0,1%; v/v)-acetronitrilo en relación 17:3 (v/v). La carrera se realizó a una temperatura controlada de 25 °C con un flujo constante de 1 mL/min.

### **Análisis espectrofotométrico de la actividad galactosiltransferasa**

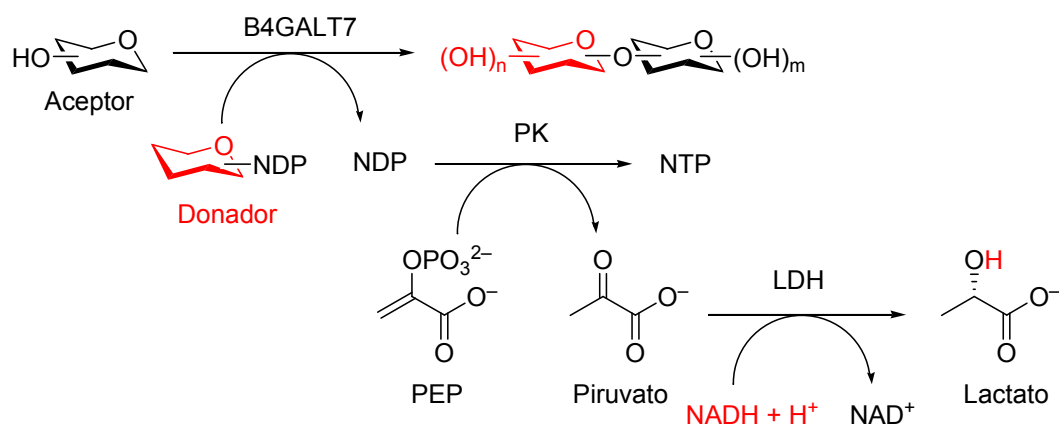
Para algunos compuestos se utilizó un método indirecto para la determinación de actividades enzimáticas. Como se puede apreciar en el **Esquema 1**, este método se basa en un ensayo multienzimático en el que, concomitantemente a la liberación de UDP por parte de B4GALT7 se produce la reacción de oxidación de NADH a  $\text{NAD}^+$ , lo que produce una disminución en la absorbancia a 340 nm ( $\epsilon^{340} = 6.220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) (Bastida *et al.*, 2001). Esta disminución de absorbancia se monitorizó durante 30 min a 25 °C, en un medio de reacción conteniendo tampón acetato (20 mM; pH 5,0), KCl (50 mM),  $\text{MnCl}_2$  (20 mM), PEP (0,7 mM), NADH (0,2 mM), piruvato quinasa (PK, 6 U) y lactato deshidrogenasa (LDH, 6 U).

### **Cálculo de las constantes cinéticas para *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl y UDP-Gal**

La medida de los parámetros cinéticos se realizó mediante HPLC.

Para *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl ello se preparó una tanda de reacciones, cada una conteniendo una concentración de *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl entre 10  $\mu\text{M}$  y 10 mM. A 1 mL de mezcla de reacción —descrito anteriormente— se le añadieron cantidades de B4GALT7 entre 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  y concentración saturante de UDP-Gal (1 mM).

Se realizó de forma análoga, pero en este caso la concentración de UDP-Gal se varió 10  $\mu\text{M}$  y 20 mM y la de *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl se mantuvo saturante (10 mM).



**Esquema 1.** El sistema multienzimático para la detección de actividad GalT está basado en la oxidación concomitante de  $NADH + H^+$  con la aparición del nucleótido difosfato (en nuestro caso, UDP) gracias a la acción de PK y LDH. En un primer paso el NDP resultante se convierte en NTP por acción de la piruvato quinasa (PK), utilizando el fosfo-enol-piruvato (PEP) como donador de grupos fosfato. El piruvato formado por la PK es reducido a lactato por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH), que oxida el NADH a  $NAD^+$ . Esta desaparición de NADH puede monitorizarse.

## Estudios de cofactores enzimáticos

Se testaron los iones  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  como posibles cofactores para B4GALT7. Los ensayos se analizaron utilizando el HPLC. Las reacciones contenían el medio de reacción estándar con concentraciones saturantes de UDP-Gal (500  $\mu M$ ) y *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl (5 mM) y  $MnCl_2$  o  $MgCl_2$  (20 mM) en un volumen final de 1 mL. Después se optimizó la cantidad de  $Mn^{2+}$  realizando una tanda de reacciones conteniendo cada una diferentes cantidades de  $MnCl_2$  (entre 10 y 400 mM) en las mismas condiciones anteriores.

## Estudios de pH óptimo

Se realizó una curva de pH para determinar el pH óptimo de B4GALT7. Los medios de reacción se prepararon como se ha descrito previamente pero utilizando distintos tampones para los diferentes pH y manteniendo constante la fuerza iónica con NaCl ( $I = 154$  mM). Para el entorno de pH 4,0-6,0 se utilizó tampón acético/acetato (10 mM); para el entorno 5,0-7,5 se usó tampón fosfato (10 mM) y para el entorno 7,5-9,0 se utilizó tampón Tris-HCl (10 mM). En todas las reacciones se utilizaron concentraciones saturantes de UDP-Gal (1 mM) y *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl (5 mM) y

cantidades de B4GALT7 entre 36 y 53  $\mu\text{g/mL}$ . Las reacciones se valoraron mediante HPLC.

### **Estudios de especificidad de sustrato**

Para estudiar la especificidad de la enzima se realizaron ensayos con diferentes aceptores y dadores en reacciones de 1 mL y una cantidad de proteína entre 29 y 56  $\mu\text{g/mL}$ , dependiendo del ensayo. La actividad con los diferentes sustratos se midió utilizando el ensayo espectrofotométrico.

Para la especificidad frente a distintos aceptores, se probaron los azúcares nucleótido UDP-Glc, GDP-Fuc y CMP-NeuAc a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  y utilizando como sustrato aceptor *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl a una concentración de 5 mM.

En cuanto a los aceptores, se probaron *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-fucopiranosido, *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido, *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-manopiranosido, *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-fucopiranosido y *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido a una concentración de 5 mM y utilizando UDP-Gal como donador a una concentración de 600  $\mu\text{M}$ .

### ***Estudio de diferentes xilopiranosidos como «aceptores trampa»***

#### **Cálculo de las constantes cinéticas para los xilopiranosidos**

La determinación de los parámetros cinéticos se valoró mediante HPLC para los xilopiranosidos **12** y **18**, y por el método espectrofotométrico para los compuestos **9**, **10**, **11**, **13**, **16**, **21**, **22** y **23** (para la numeración, ver más adelante). Se utilizó el medio de reacción previamente descrito, conteniendo una concentración saturante de UDP-Gal (600  $\mu\text{M}$ ) y con diferentes concentraciones de cada xilopiranosido (entre 10  $\mu\text{M}$  y 20 mM) en un volumen final de reacción de 1 mL. Las cantidades de proteína utilizadas oscilaron entre 11 y 137  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Ensayos de $\text{IC}_{50}$**

En un medio de reacción estándar conteniendo UDP-Gal (1 mM) y **1** (10 mM), se añadieron diferentes cantidades de los xilopiranosido (entre 10  $\mu\text{M}$  y 20 mM) en un

volumen final de 1 mL. Las cantidades de B4GALT7 utilizadas oscilaron entre 5 y 20 µg/mL.

La cantidad de disacárido Gal-Xyl-O-*p*-Nph formado por la unión de la galactosa a **1** se determinó mediante HPLC. Para todos los xilopiranósidos excepto para **18** y **22** se utilizó una columna C18 (*Lichrosorb RP18*) y una fase móvil de TFA (0,1 % en H<sub>2</sub>O)-CH<sub>3</sub>CN 17:3 (v/v). Para los xilopiranósidos **18** y **22** se utilizó una columna C18 (*Mediterranean sea<sub>18</sub>*) con una fase móvil de TFA (0,1 % en H<sub>2</sub>O)-CH<sub>3</sub>CN 87:13 (v/v).

### **Cálculo de la $k_i$ del 2-(6-hidroxinaftil) $\beta$ -D-xilopiranósido frente a *p*-nitrofenil $\beta$ -D-xilopiranósido**

Para calcular la  $k_i$  del compuesto 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido (**17**) frente a *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl (**1**) se realizaron estudios de inhibición de la actividad de B4GALT7 frente a **1** (entre 0,1 y 10 mM) en presencia de concentraciones crecientes del «inhibidor» **18** (0, 250 y 500 µM). En estos ensayos no fue posible utilizar concentraciones de **17** por encima de 1 mM debido a que a partir de esa concentración B4GALT7 sufre una fuerte inhibición por exceso de sustrato. Todas las reacciones se realizaron con concentración saturante de UDP-Gal (600 µM) en un volumen final de 1 mL y con cantidades de proteína entre 12 y 27 µg/mL, dependiendo de cada reacción.

La cantidad de disacárido formada se analizó mediante HPLC, utilizando para ello una columna C18 (*Mediterranean sea<sub>18</sub>*) con una fase móvil de TFA (0,1 % en H<sub>2</sub>O)-CH<sub>3</sub>CN en relación 87:13 (v/v).

### **Ensayos de los xilopiranósidos como agentes antiproliferantes**

Para la determinación de la actividad antiproliferante de los xilopiranósidos, las células A549 fueron sembradas a una concentración de 3.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en un medio de cultivo que contenía un 10 % de suero bovino fetal (FBS). Pasadas 4 h tras la siembra de cultivo, las células fueron privadas de suero durante 24 h. Después se añadió medio sin FBS con 25 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) en presencia de diferentes concentraciones de los xilopiranósidos **9**, **10**, **15**, **16**, **18** y **22**. Cuatro días después, se determinó el número de células viables con un test de MTT.

## Segunda parte: síntesis de xilopiranosidos con aglicones hidrófobos

### *Procedimientos generales*

Todos los disolventes fueron adquiridos a Scharlab. Los disolventes anhidros se prepararon mediante las técnicas habituales de secado (Perrin *et al.*, 1980) según se indica a continuación y siempre inmediatamente antes de su utilización: el tolueno se destiló sobre Na y benzofenona bajo atmósfera de argón y el diclorometano y el acetonitrilo se destilaron sobre CaH<sub>2</sub> bajo atmósfera de argón.

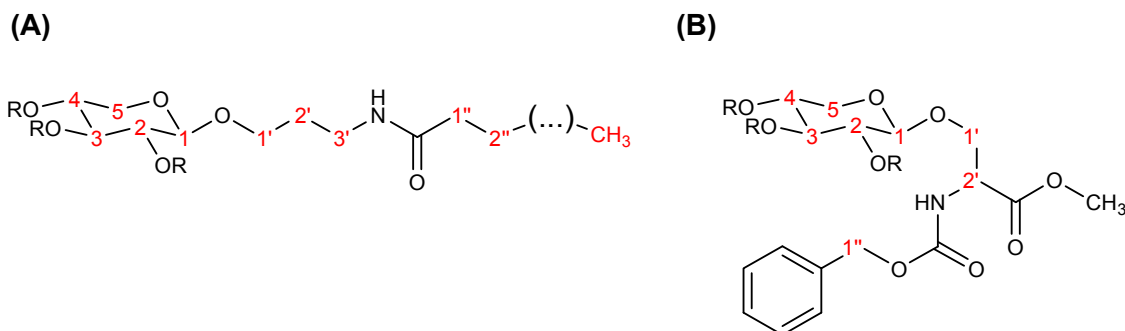
Los reactivos utilizados fueron obtenidos en Sigma-Aldrich y Acros Organics.

El seguimiento de las reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas de gel de sílice tipo 60 F<sub>254</sub> de 0,2 mm de espesor (Merk). El análisis de las placas se llevó a cabo en una lámpara de UV de 254/365 nm y por revelado con reactivo de Mostain (molibdato amónico-Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O: 50 g de molibdato amónico, 1 g de sulfato cérico (IV), 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y H<sub>2</sub>O hasta 1 L), con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado en etanol al 5 % y con permanganato en agua.

En la mayoría de las reacciones la separación y purificación de los productos obtenidos se realizó mediante cromatografía *flash* en columna de gel de sílice con un tamaño de partícula de 230-400 mesh (Merk). Los eluyentes empleados se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen:volumen.

Todos los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron a 20 °C en diferentes disolventes deuterados (Merk) y con volúmenes de muestra entre 0,6-0,7 mL, en tubos de 5 mm.

La espectroscopía por resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN) se realizó en espectrómetros Varian, modelos Gemini-200 (200 MHz), Inova-300 (300 MHz), Inova-400 (400 MHz) y Bruker-300 (300 MHz). En cada caso, junto al disolvente deuterado, está indicada la frecuencia en la que se ha registrado el mismo. También se indican los desplazamientos químicos en la escala  $\delta$  (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; m, multiplete; dd; doble doblete; dt, doble triplete), el número de protones



**Figura 18.** Numeración de los átomos de carbono en los xilopiranósidos sintetizados.

(A) En los amido-xilopiranósidos, (B) en la xilopiranosil serina.

(deducidos por integración), el valor de las constantes de acoplamiento  $J$  (Hz) y la asignación estructural, designando los átomos de carbono e hidrógeno como se muestra en la **Figura 18**.

Todos los espectros de RMN de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se realizaron en espectrómetros Varian, en los modelos Gemini-200 (50 MHz), Inova-300 (75 MHz) e Inova-400 (100 MHz). En cada caso se indican los desplazamientos químicos de las señales en la escala de  $\delta$  (ppm) y la asignación estructural.

La espectroscopía de RMN bidimensional (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) se ha realizado en espectrómetros Varian, modelos Inova-300 e Inova-400, empleando la secuencia de pulsos estándar.

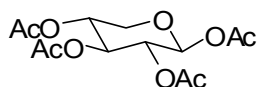
Para la espectrometría de masas se utilizó un espectrómetro de baja resolución VG 12-1250, mediante inyección directa de la muestra, usando la técnica de impacto electrónico con una energía de 70 eV y mediante ionización por electrospray (IES-EM) en un equipo Hewlett Packard-110 MSD. Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa/carga ( $m/z$ ).

Las medidas de rotación óptica fueron realizadas en un polarímetro Perkin-Elmer 241 MC, en células de cuarzo de 1 dm, utilizando luz amarilla de sodio, a la temperatura de 25 °C y en los disolventes y concentraciones (g/100 mL) indicados en cada caso.

Los análisis elementales han sido realizados en el servicio de análisis del Centro de Química Orgánica Manuel Lora-Tamayo con un analizador Heraeus CHN-O Rapid, y se expresan en tanto por ciento.

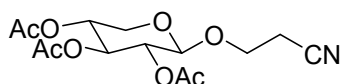
## Síntesis de xilopiranosidos con grupos amido en el aglicón

### Preparación del 1,2,3,4-tetra-O-acetil $\beta$ -D-xilopiranososa (2)



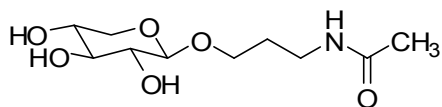
Se calentó una mezcla de D-xilosa (40,0 g), acetato sódico (10,0 g) y anhídrido acético (160 mL) a 90 °C hasta que se disolvió todo el sólido. La mezcla se enfrió, se vertió sobre agua-hielo (aprox. 1 L) y se agitó vigorosamente durante 2 h para desmenuzar el precipitado formado. El sólido se filtró y se lavó con abundante agua fría. Después se cristalizó con EtOH para obtener un sólido blanco (48 g, 57%). El análisis del producto resultó en concordancia con los datos experimentales conocidos.

### Preparación del 2-cianoetil 2,3,4-tri-O-acetil $\beta$ -D-xilopiranosido (3)



**2** (5,0 g; 15,2 mmol) se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (125 mL) y se añadieron 3-hidroxi-propionitrilo (1,3 mL; 1,2 eq) y  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}$  (1,86 mL; 1 eq.). La mezcla se agitó durante 1 h a t. a. bajo atmósfera de argón. Después se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La fase orgánica se concentró *in vacuo* y el residuo resultante se cristalizó en MeOH, obteniendo el producto **3** (4,3 g; 12,9 mmol; 82%) como un sólido blanco. P. f.: 161-165 °C.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-57,1^\circ$  (c 1,49;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5,17 (t; 1H;  $J = 8,4$  Hz; H-3); 4,98-4,88 (m, 2H, H-2, H-4); 4,56 (d,  $J = 6,6$  Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 4,15 (dd,  $J_{4,5\text{ec}} = 4,8$  Hz;  $J_{5\text{ax},5\text{ec}} = 12,0$  Hz; H-5 $_{\text{ec}}$ ); 4,00 (dt; 1H;  $J_{1'a,2'} = 5,7$  Hz;  $J_{1'a,1'b} = 9,9$  Hz; H-1' $_{\text{a}}$ ); 3,72 (dt;  $J_{1'b,2'} = 6,3$  Hz;  $J_{1'a,1'b} = 9,9$  Hz; H-1' $_{\text{b}}$ ); 3,40 (dd; 1H;  $J_{4,5\text{ax}} = 8,4$  Hz;  $J_{5\text{ec},5\text{ax}} = 12,0$  Hz; H-5 $_{\text{ax}}$ ); 2,63 (t, 2H,  $J = 6,0$  Hz, H-2' $_{\text{a}}$ , H-2' $_{\text{b}}$ ); 2,09 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 2,05 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170,0 ( $\text{C=O}$ ); 169,8 ( $\text{C=O}$ ); 169,6 ( $\text{C=O}$ ); 117,2 (C-N); 100,75 (C-1); 70,8 (C-3); 70,0; 68,5 (C-2, C-4); 63,8 (C-1'); 61,9 (C-5); 20,7 ( $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 19,0 (C-2'). MS (ES)  $m/z$  (calcd. 329,1): 352,0 (M+23). A. E. Calcd. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_8$ : C 51,06; H 5,82; N 4,25. Exp.: C 50,86; H 5,78; N 4,16.

## Preparación de 3-acetamido-propil $\beta$ -D-xilopiranosido (9)



Se disolvió **3** (100 mg; 0,3 mmol) en de una mezcla AcOEt-MeOH (2:1, v/v, 9 mL) y se añadieron Pd/C (50 mg) y ácido trifluoro acético (34  $\mu$ L; 1,5 eq). La mezcla se agitó durante 18 h a t. a. bajo atmósfera de hidrógeno. Después, la mezcla se filtró sobre Celite<sup>®</sup>, se lavó con una disolución de AcOEt-MeOH (2:1, v/v) y se concentró para obtener la amina **I**. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5,23 (t; 1H,  $J$  = 9,2 Hz; H-3); 4,98-4,82 (m, 2H, H-2, H-4); 4,61 (d; 1H;  $J$  = 7,3 Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 4,08 (dd; 1H;  $J_{4,5ec}$  = 5,5 Hz;  $J_{5ax,5ec}$  = 11,7 Hz, H-5 $_{ec}$ ); 3,94 (m, 1H, H-1' $_{a}$ ), 3,69 (m, 1H, H-1' $_{b}$ ); 3,47 (dd; 1H;  $J_{4,5ax}$  = 9,7 Hz;  $J_{5ec,5ax}$  = 11,7 Hz; H-5 $_{ax}$ ); 3,02 (t; 2H;  $J$  = 7,1 Hz; H-3' $_{a}$ ; H-3' $_{b}$ ); 2,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COO); 2,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COO); 2,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COO); 1,98-1,88 (m, 2H, H-2' $_{a}$ , H-2' $_{b}$ ). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  171,5 (CO); 102,1 (C-1); 73,2 (C-3); 72,7 (C-2); 70,4 (C-4); 68,0 (C-1'); 63,3 (C5); 38,9 (C-3'); 28,6 (C-2'), 20,5 (CH<sub>3</sub>-COO).

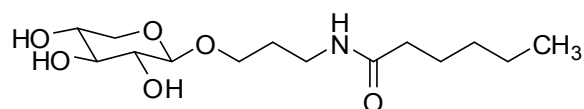
Se disolvió la amina **I** (137 mg; 0,30 mmol) en piridina seca (2 mL) y se añadió anhídrido acético (2 mL). La mezcla se agitó a t. a. durante 18 h, después se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH 20:0 $\rightarrow$ 20:1), obteniendo así el 3-acetamido-propil 2,3,4-tri-O-acetil  $\beta$ -D-xilopiranosido (**4**) puro (130 mg; 0,30 mmol; 100 %). <sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5,25 (t; 1H;  $J$  = 9,0 Hz, H-3); 5,05-4,79 (m, 2H, H-2, H-4); 4,60 (d,  $J$  = 7,3 Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 4,10 (dd; 1H;  $J_{4,5ec}$  = 5,1 Hz;  $J_{5ec,5ax}$  = 11,7 Hz; H-5 $_{ec}$ ); 3,88 (m, 1H, H-1' $_{a}$ ); 3,66-3,39 (m, 2H, H-1' $_{b}$ , H-5 $_{ax}$ ); 3,31-3,19 (m; 2H, H-3' $_{a}$ ; H-3' $_{b}$ ); 2,07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COO); 2,05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COO); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COO); 1,95 (s, 3H, N-CO-CH<sub>3</sub>); 1,88-1,70 (m, 2H, H-2' $_{a}$ , H-2' $_{b}$ ). MS (ES)  $m/z$  (calcdo. 375,4): 376,3 (M+1); 398,0 (M+23). A. E. Calcdo. para C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>9</sub>: C 51,20; H 6,71; N 3,73. Exp.: C 51,09; H 6,63; N 3,69.

**4** (100 mg; 0,27 mmol) fue disuelto en metanol (15 mL) y se trató con MeONa 0,5 M (5 mL). La mezcla se agitó durante 1 h a t. a. y después fue neutralizada con Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>) y filtrada. El disolvente fue evaporado en rotavapor para dar **9** (67,3 mg; 0,26 mmol; 98 %).  $[\alpha]_D^{25}$  -41,6° (c 1,25; H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 Mz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  4,20 (d; 1H;  $J$  = 7,4 Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 3,92-3,82 (m, 2H, H-5 $_{ec}$ ; H-1' $_{a}$ ); 3,57 (m, 1H, H-1' $_{b}$ ); 3,47 (m, 1H, H-4); 3,36-3,12 (m, 5H, H-3, H-2, H-5 $_{ax}$ , H-3' $_{a}$ , H-3' $_{b}$ ); 1,92 (s, 3H,



$\text{CH}_3\text{-CO}$ ), 1,78 (m, 2H, H-2'<sub>a</sub>, H-2'<sub>b</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  172,1 ( $\text{C=O}$ ); 103,9 (C-1); 76,3 (C-3); 73,7 (C-2); 70,0 (C-4); 67,2 (C-1'); 65,8 (C-5); 36,6 (C-3'); 29,1 (C-2'); 21,4 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ). MS (ES)  $m/z$  (calcdo. 249,1): 250,1 (M+1); 272,0 (M+23). A. E. calcdo. para  $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ : C 48,19; H 7,68; N 5,62. Exp.: C 47,99; H 7,88; N 5,57.

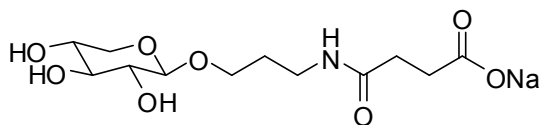
### Preparación de 3-hexanamido-propil $\beta$ -D-xilopiranosido (10)



Se disolvió la amina **I** (274 mg; 0,61 mmol), preparada como se ha descrito anteriormente, en piridina seca (2 mL) y se añadió anhídrido hexanoico (278  $\mu\text{L}$ , 2 eq.). La mezcla se agitó durante 3 h a t. a. y después se concentró y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice (Hex-AcOEt 1:1) para dar el 3-hexanamido-propil 2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-xilopiranosido (**5**) puro (129 mg; 0,30 mmol; 50 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5,95 ( $s_{\text{ancho}}$ , 1H, H-N); 2,15 (t;  $J = 9,0$  Hz; H-3); 5,02-4,82 (m, 2H, H-2, H-4); 4,42 (d; 1H;  $J = 7,2$  Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 4,10 (dd; 1H;  $J_{4,5\text{ec}} = 5,4$  Hz;  $J_{5\text{ax},5\text{ec}} = 11,7$  Hz; H-5 $_{\text{ec}}$ ); 3,89 (m, 1H, H-1'<sub>a</sub>); 3,53 (m, 1H, H-1'<sub>b</sub>); 3,45-3,18 (m, 3H, H-5 $_{\text{ax}}$ , H-3'<sub>a</sub>, H-3'<sub>b</sub>); 2,14 (t; 2H;  $J = 7,5$  Hz; H-1''<sub>a</sub>; H-1''<sub>b</sub>); 2,05 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 2,03 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 1,82-1,68 (m, 2H, H-2'<sub>a</sub>, H-2'<sub>b</sub>); 1,66-1,52 (m, 2H, H-2''<sub>a</sub>, H-2''<sub>b</sub>); 1,37-1,21 (m, 4H, H-3''<sub>a</sub>, H-3''<sub>b</sub>, H-4''<sub>a</sub>, H-4''<sub>b</sub>); 0,88 (t;  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_3$ ). A. E. Calcdo. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_9$ : C 55,67; H 7,71; N 3,25. Exp.: C 55,39; H 7,59; N 3,22.

**5** (100 mg; 0,23 mmol) fue desacetilado en condiciones similares a las descritas para **4**, obteniéndose el producto **10** (64,2 mg; 0,21 mmol; 91 %).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -40,4^\circ$  (c 1,53;  $\text{H}_2\text{O}$ ).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  4,19 (d;  $J = 7,6$  Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 3,91-3,81 (m, 2H, H-5 $_{\text{ec}}$ ; H-1'<sub>a</sub>); 3,56 (m, 1H, H-4); 3,36-3,12 (m, 5H, H-2, H-3, H-5 $_{\text{ax}}$ , H-3'<sub>a</sub>, H-3'<sub>b</sub>); 2,16 (t;  $J = 7,2$  Hz; H-1''<sub>a</sub>; H-1''<sub>b</sub>); 1,78 (m, 2H, H-2'<sub>a</sub>, H-2'<sub>b</sub>); 1,60 (m, 2H, H-2''<sub>a</sub>, H-2''<sub>b</sub>); 1,40-1,24 (m, 4H, H-3''<sub>a</sub>, H-3''<sub>b</sub>, H-4''<sub>a</sub>, H-4''<sub>b</sub>); 0,91 (t, 3H;  $J = 7,2$  Hz;  $-\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  175,5 ( $\text{C=O}$ ); 103,9 (C-1); 76,7 (C-3); 73,7 (C-2); 70,0 (C-4); 67,2 (C-1'); 65,8 (C-5); 36,4 (C-3'); 36,0 (C-1''); 31,3 (C-3''); 29,1 (C-2'); 25,6 (C-2''), 22,3 (C-4''); 13,1 ( $\text{CH}_3$ ). MS (ES)  $m/z$  (calcdo. 305,2): 306,3 (M+1); 328,3 (M+23). A. E. Calcdo. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ : C 55,06; H 8,91; N 4,59. Exp.: C 54,78; H 9,06; N 4,52.

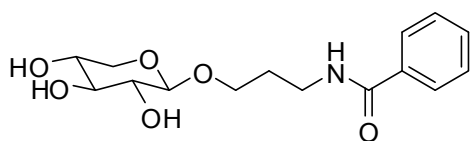
## Preparación de N-[O-( $\beta$ -D-xilopiranosil)-3-hidroxipropil]-succinamato de sodio (11)



La amina **I** (274 mg; 0,61 mmol) en piridina seca (2 mL) y se añadió anhídrido succínico (60 mg, 2 eq). La mezcla se agitó durante 2 h a t. a., después se concentró y el residuo se purificó en columna cromatográfica de gel de sílice (AcOEt-MeOH 10:0→10:1) para obtener el N-[O-(2,3,4-triacetil  $\beta$ -D-xilopiranosil)-3-hidroxipropil]-succinamato de piridinio (**5**) puro (387 mg; 0,46 mmol; 75 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6,49 (s, 1H, H-N); 5,21 (t; 1H;  $J = 9,0$  Hz; H-3); 5,02-4,86 (m, 2H, H-2, H-4); 4,42 (d; 1H;  $J = 7,3$  Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 4,11 (dd; 1H;  $J_{4,5\text{ec}} = 5,1$  Hz;  $J_{5\text{ax},5\text{ec}} = 12,0$  Hz; H-5 $_{\text{ec}}$ ); 3,91 (m, 1H, H-1' $_{\text{a}}$ ); 3,56 (m, 1H, H-1' $_{\text{b}}$ ); 3,42-3,26 (m, 3H, H-5 $_{\text{ax}}$ , H-3' $_{\text{a}}$ , H-3' $_{\text{b}}$ ); 2,66 (m, 2H, H-1'' $_{\text{a}}$ , H-1'' $_{\text{b}}$ ); 2,56 (m, 2H, H-2'' $_{\text{a}}$ , H-2'' $_{\text{b}}$ ); 2,06 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 2,03 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 1,78 (m, 2H, H-2' $_{\text{a}}$ , H-2' $_{\text{b}}$ ). A. E. Calcd. para  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{11}$ : C 53,90; H 6,29; N 5,47. Exp.: C 53,14; H 6,27; N 5,42.

El producto **6** (160 mg; 0,19 mmol) fue desacetilado en condiciones similares a las descritas para **4**, obteniéndose el producto **11** (62,0 mg; 0,19 mmol; 98 %).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -31,9^\circ$  ( $c$  1,65;  $\text{H}_2\text{O}$ ).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  4.20 (d,  $J = 7.8$  Hz, H-1 $_{\beta}$ ), 3.92-3.82 (m, 2H, H-5 $_{\text{ec}}$ , H-1' $_{\text{a}}$ ), 3.57 (m, 1H, H-1' $_{\text{b}}$ ), 3.48 (m, 1H, H-4), 3.37-3.14 (m, 5H, H-3, H-3' $_{\text{a}}$ , H-3' $_{\text{b}}$ , H-2, H-5 $_{\text{ax}}$ ), 2.63-2.55 (m, 2H, H-2'' $_{\text{a}}$ , H-2'' $_{\text{b}}$ ), 2.51-2.43 (m, 2H, H-1'' $_{\text{a}}$ , H-1'' $_{\text{b}}$ ), 1.78 (m, 2H, H-2' $_{\text{a}}$ , H-2' $_{\text{b}}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  175,1 ( $\text{CO-ONa}$ ); 173,4 ( $\text{NH-CO}$ ); 103,8 (C-1); 76,6 (C-3); 73,7 (C-2); 70,0 (C-4); 67,2 (C-1'); 65,7 (C-5); 36,5 (C-3''); 30,4; 29,1 (C-1'', C-2''); 28,6 (C-2'). MS (ES)  $m/z$  (calcd. 329,1): 330,1 ( $\text{M}+1$ ). A. E. Calcd. para  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NNaO}$ : C 43,77; H 6,12; N 4,25. Exp.: C 43,08; H 6,12; N 3,90.

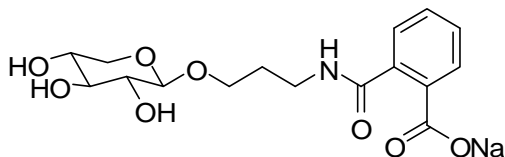
## Preparación de 3-benzamido-propil $\beta$ -D-xilopiranosido (12)



La amina **I** (274 mg; 0,61 mmol) fue disuelta de piridina seca (2 mL) y se añadió cloruro de benzoilo (215  $\mu$ L, 3 eq). La mezcla se agitó durante 18 h a t. a. y se concentró. El residuo se extrajo con AcOEt, se concentró y se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (Hex-AcOEt 3:1 $\rightarrow$ 1:1), obteniendo así el 3-benzamido-propil 2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-xilopiranosido (**7**), puro (54 mg; 0,12 mmol; 20%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,77 (m, 2H, H-o); 7,53-7,38 (m, 3H, H-m, H-p); 6,69 (s, 1H, H-N); 5,18 (t; 1H;  $J = 9,0$  Hz; H-3); 5,01-4,84 (m, 2H, H-2, H-4); 4,48 (d; 1H;  $J = 6,9$  Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 4,08 (dd; 1H;  $J_{4,5\text{ax}} = 5,1$  Hz;  $J_{5\text{ec},5\text{ax}} = 11,7$  Hz; H-5 $_{\text{ec}}$ ); 3,93 (m, 1H, H-1' $_{\text{a}}$ ); 3,71-3,39 (m, 3H, H-1' $_{\text{b}}$ , H-3' $_{\text{a}}$ , H-3' $_{\text{b}}$ ); 3,34 (dd; 1H;  $J_{4,5\text{ax}} = 9,3$  Hz;  $J_{5\text{ec},5\text{ax}} = 11,7$  Hz; H-5 $_{\text{ax}}$ ); 2,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 2,02 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 1,89 (m, 2H, H-2' $_{\text{a}}$ , H-2' $_{\text{b}}$ ). A. E. calcd. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_9$ : C 57,66; H 6,22; N 3,20. Exp.: C 57,37; H 6,11; N 3,18.

**7** (54 mg; 0,12 mmol) fue desacetilado en condiciones similares a las descritas para **4**, obteniéndose el producto **12** (37 mg; 0,12 mmol; 98 %).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -34,4^\circ$  (c 1,42;  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7,82-7,78 (m, 2H, H-o); 7,52 (m, 1H, H-p); 7,45 (m, 2H, H-m); 4,22 (d; 1H;  $J = 7,4$  Hz; H-1 $_{\beta}$ ); 3,92 (m, 1H, H-1' $_{\text{a}}$ ); 3,85 (dd; 1H;  $J_{4,5\text{ec}} = 5,5$  Hz;  $J_{5\text{ax},5\text{ec}} = 12,3$  Hz; H-5 $_{\text{ec}}$ ); 3,64 (m, 1H, H-1' $_{\text{b}}$ ); 3,57-3,42 (m, 3H, H-3' $_{\text{a}}$ , H-3' $_{\text{b}}$ , H-4); 3,31 (m, 1H, H-3); 3,24-3,15 (m, 2H, H-2, H-5 $_{\text{ax}}$ ); 1,91 (m, 2H, H-2' $_{\text{a}}$ , H-2' $_{\text{b}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  169,0 ( $\text{CO-Ph}$ ); 134,6 (aromático cuaternario); 131,4 (C-p); 128,4 (C-m); 127,0 (C-o); 104,0 (C-1); 76,7 (C-3); 73,8 (C-2); 70,0 (C-4); 67,4 (C-1'); 65,8 (C-5); 37,1 (C-3'); 29,2 (C-2'). MS (ES)  $m/z$  (calc. 311.1): 312.0 (M+1), 334.1 (M+23). A. E. Calcd. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ : C 57,87; H 6,80; N 4,50. Exp.: C 57,58; H 6,78; N 4,76.

### Preparación de *N*-[*O*-( $\beta$ -D-xilopiranosil)-3-hidroxipropil]-ftalamato de sodio (13)

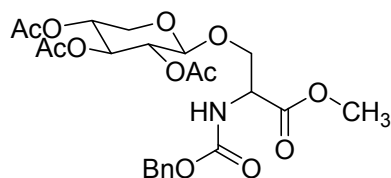


Se disolvió la amina **I** (274 mg; 0,61 mmol) en piridina seca (2 mL) y se añadió a la disolución anhídrido ftálico (221 mg; 2,5 eq). La mezcla se agitó durante 2 h a t. a. y se concentró. El residuo se extrajo con AcOEt, se concentró en rotavapor y se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt:MeOH 10:0→10:1), obteniendo así el *N*-[*O*-(2,3,4-triacetil  $\beta$ -D-xilopiranosil)-3-hidroxipropil]-ftalamato de piridinio (**8**) puro (360 mg; 0,49 mmol; 80 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5,14 (t, 1H,  $J = 8,8$  Hz, H-3); 4,95-5,75 (m, 2H, H-2, H-4); 4,43 (d, 1H,  $J = 7,1$  Hz, H-1 $_{\beta}$ ); 4,02 (dd, 1H,  $J_{4,5\text{ec}} = 5,4$  Hz;  $J_{5\text{ax},5\text{ec}} = 11,7$  Hz, H-5 $_{\text{ec}}$ ); 3,89 (m, 1H, H-1' $_{\text{a}}$ ); 3,67-3,38 (m, 3H, H-1' $_{\text{b}}$ , H-3' $_{\text{a}}$ , H-3' $_{\text{b}}$ ); 3,30 (dd, 1H,  $J_{4,5\text{ax}} = 9,5$  Hz;  $J_{5\text{ec},5\text{ax}} = 11,7$  Hz, H-5 $_{\text{ax}}$ ); 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 1,99 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 1,98 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-COO}$ ); 1,87 (m, 2H, H-2' $_{\text{a}}$ , H-2' $_{\text{b}}$ ). A. E. Calcd. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$ : C 58,06; H 6,03; N 6,45. Exp: C 57,83; H 5,97; N 6,34.

El producto **8** (280 mg; 0,64 mmol) fue desacetilado en condiciones similares a las descritas para **4**, obteniéndose el producto **13** (229 mg; 0,61 mmol; 95 %).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -24,3^{\circ}$  (c 1,50;  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,96 (m, 1H); 7,68-7,48 (m, 2H); 7,43 (m, 1H); 4,23 (d; 1H;  $J = 7,6$  Hz; H-1); 3,94 (m, 1H, H-1' $_{\text{a}}$ ); 3,83 (dd; 1H;  $J_{4,5\text{ec}} = 5,4$ ;  $J_{5\text{ec},5\text{ax}} = 11,5$  Hz; H-5 $_{\text{ec}}$ ); 3,67 (m, 1H, H-1' $_{\text{b}}$ ); 3,52-3,40 (m, 3H, H-3' $_{\text{a}}$ , H-3' $_{\text{b}}$ , H-4); 3,34-3,12 (m, 2H, H-2, H-5 $_{\text{ax}}$ ); 1,98-1,84 (m, 2H, H-2' $_{\text{a}}$ , H-2' $_{\text{b}}$ ).;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  172,4 (NH-CO); 170,6 (COONa); 135,4; 131,9; 129,6 (aromáticos); 104,0 (C-1); 77,7 (C-3); 74,8 (C-2); 71,2 (C-4); 68,8 (C-1'); 67,0 (C-5); 39,5 (C-3'); 28,4 (C-2'). MS (ES)  $m/z$  (calcd. 354,3): 356,0 (M+2). A. E. Calcd. para  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NNaO}_8$ : C 50,93; H 5,34; N 3,71. Exp.: C 51,03; H 5,61; N 3,54.

## Preparación de O<sub>γ</sub>-xilopiranosil-L-serina

### Preparación de O<sub>γ</sub>-(2,3,4-tri-O-acetil β-D-xilopiranosil)-N-Cbz-L-serina-metil éster (15)

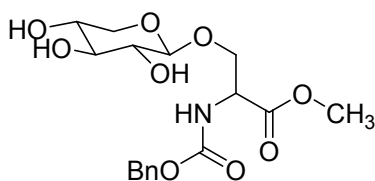


A una disolución de L-serina-metil éster (0,5 g, 4,20 mmol) en piridina (10 mL) se adicionó bencil-cloroformiato (Cbz, 0,7 mL; 1,5 eq.) a 0 °C (en baño de hielo). La mezcla se agitó durante 1 h en hielo. Después, se añadieron AcOEt (20 mL) y CuSO<sub>4</sub> (10 mL). La fase orgánica se apartó y la fase acuosa se lavó con AcOEt (2 x 10 mL), añadiendo los lavados a la fase orgánica apartada. La fase orgánica resultante se lavó con BRINE (15 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró en rotavapor. El residuo se purificó en columna de gel de sílice (Hex-AcOEt 3:1→1:1) para obtener el producto **14** (570 mg; 2,25 mmol; 54 %) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,35 (s, 5H, aromáticos); 5,68 (s<sub>ancho</sub>, 1H, H-N); 5,14 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 4,54-4,40 (m, 1H, N-CH-CO); 4,08-3,87 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH); 3,80 (s, 3H, CO-O-CH<sub>3</sub>); 2,22-2,02 (m, 1H, H-O).

Se disolvieron N-Cbz-L-serina-metil éster **14** (200 mg; 0,79 mmol) y xilosa peracetilada (500 mg, 2 eq) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (15 mL). Se añadió tamiz molecular (4 Å; 4,5 g) y trimetilsilil-trifluorometanosulfonato (78 µL; 0,5 eq). La reacción se tuvo en agitación a t. a. durante 2 h bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se diluyó con de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) y se adicionaron unas gotas de trietil amina. Tras la evaporación del disolvente y purificación por columna cromatográfica (Hex-AcOEt 3:1→1:1) se obtuvo un residuo (340 mg) que fue purificado mediante una segunda columna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 9:1), obteniéndose el producto **15** (303 mg; 0,59 mmol; 75 %) como un sólido blanco. P. f.: 102-104 °C. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -29,4° (c 1.03, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,42-7,23 (m, 5H, aromáticos); 5,56 (d; 1H; J = 8,2 Hz; H-N); 5,12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 5,09 (t; 1H; J = 7,8 Hz; H-3); 4,90-4,81 (m, 2H, H-2, H-4); 4,51 (m, 1H, H-2'); 4,48 (d; J = 6,5 Hz; H-1<sub>β</sub>); 4,22 (dd; 1H; J<sub>1'a,2'</sub> = 2,7 Hz; J<sub>1'a,1'b</sub> = 10,1 Hz; H-1'a); 4,03 (dd; 1H; J<sub>4,5ec</sub> = 4,7 Hz; J<sub>5ax,5ec</sub> = 12,1 Hz; H-5<sub>ec</sub>); 3,79 (dd; 1H; J<sub>1'b,2'</sub> = 3,1 Hz; J<sub>1'a,1'b</sub> = 10,1 Hz; H-1'b); 3,76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-CO); 3,34 (dd;

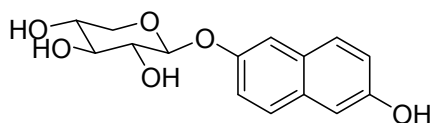
1H;  $J_{4,5ax} = 7,8$  Hz;  $J_{5ax,5ec} = 12,1$  Hz; H-5<sub>ax</sub>), 2,04 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-COO); 2,03 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-COO); 2,02 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-COO). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.3, 170.2, 170.1, 169.6 (CH<sub>3</sub>-C=O-O, C-3'), 156.1 (C-4'), 136.3 (C-6'), 128.8, 128.5, 128.4 (C-7', C-8', C-9', C-10', C-11'), 100.7 (C-1), 70.7 (C-3), 70.2 (C-4), 69.2 (C-1'), 68.6 (C-2), 67.4 (C-5'), 61.7 (C-5), 54.4 (C-2'), 53.0 (CH<sub>3</sub>-O-CO), 21.0, 20.9, 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O). MS (ES)  $m/z$  (calcdo. 511,2): 534,2 (M+23). A. E. Calcdo. para C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>12</sub>: C 54,01; H 5,71; N 2,74. Exp.: C 53,88; H 5,71; N 2,74.

### Preparación de O<sub>γ</sub>-β-D-xilopiranosil-N-Cbz-L-serina-metil éster (16)



A una mezcla de KCN (6,5 mg; 0,09 mmol) y metanol (10 mL) se añadió **15** (100 mg; 0,19 mmol). La mezcla se agitó a t. a. hasta la completa conversión en el xilopiranosido desacetilado (**1h**). Una vez terminada, se añadió una cantidad equimolar de Dowex<sup>®</sup> 50X4 (Na<sup>+</sup>) y Dowex<sup>®</sup> 1X8 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La mezcla se agitó unos minutos, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 25:0→25:1), obteniéndose el producto puro **16** (49,8 mg; 0,13 mmol; 70 %) como un sólido blanco. P. f.: 42-46 °C.  $[\alpha]_D^{25}$ : -23.4° (c 1.13, MeOH). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7,40-7,23 (m, 5H, aromáticos); 5,09 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>); 4,44 (m, 1H, H-2'); 4,26 (dd; 1H;  $J_{2',1'a} = 3,7$  Hz;  $J_{1'a,1'b} = 10,1$  Hz; H-1'a); 4,16 (d; 1H;  $J = 7,7$  Hz; H-1<sub>β</sub>); 3,81 (dd; 1H;  $J_{4,5ec} = 5,3$  Hz;  $J_{5ax,5ec} = 11,3$  Hz; H-5<sub>ec</sub>); 3,74-3,67 (m, 4H, H-1'b, O-CH<sub>3</sub>); 3,43 (m, 1H, H-4); 3,27 (t; 1H;  $J = 8,8$  Hz; H-3); 3,19-3,09 (m, 2H, H-2, H-5<sub>ax</sub>). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 172,2 (C=O-O); 158,7 (N-CO-O); 138,1 (C-6'); 129,5; 129,0; 128,9 (aromáticos); 105,1 (C-1); 77,6 (C-3); 74,8 (C-2); 71,0 (C-4); 70,5 (C-1'); 67,8 (C-5'); 67,0 (C-5); 55,7 (C-2'); 53,0 (O-CH<sub>3</sub>). MS (ES)  $m/z$  (calc. 385.1): 408.0 (M+23). A. E. calcdo. para C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub>: C 52,98; H 6,02; N 3,63; O 37,37; exp.: C 54,03; H 5,96; N 3,56.

## Síntesis de 2-(6-hidroxi-naftil) $\beta$ -D-xilopiranosido (**18**)



Se disolvió 2,6-dihidroxi-naftaleno (200 mg, 1,24 mmol) en dioxano anhidro (2 mL) y se calentó a 100 °C durante 30 min. A la disolución se le añadió piridina (88  $\mu$ L) y cloruro de benzoilo (400  $\mu$ L; 2,3 eq.). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 4 h y después se vertió en una mezcla de agua-hielo (25 mL). El sólido se filtró a vacío para dar una mezcla de 2,6-dihidroxi-naftaleno mono y dibenzoilado (198 mg). El sólido se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (2 mL) y se añadieron 1,2,3,4-tetra-O-acetil  $\beta$ -D-xilopiranososa (143,2 mg; 0,46 mmol) y tamiz molecular (4 Å; 200 mg) dejándose con agitación durante 20 min a t. a. Después se añadió  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}$  (170  $\mu$ L; 4,5 eq.) y se mantuvo a t. a. durante 45 min. La mezcla se lavó con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y después con agua. La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en gel de sílice (Hex-AcOEt 10:1 $\rightarrow$ 4:1), obteniéndose el sólido **17** (198,6 mg; 0,38 mmol; 35 %).

El compuesto **17** se disolvió (100 mg; 0,19 mmol) en 10 mL de MeOH y se añadió MeONa 0,5 M (5 mL). La reacción se dejó con agitación durante 2 h a t. a. Una vez terminada, la mezcla se neutralizó con Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ), se filtró y se concentró. El residuo se pasó por una columna de gel de sílice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 20:1 $\rightarrow$ 20:4) obteniéndose así el producto puro **18** (55,5 mg; 0,19 mmol; 100 %). El análisis del producto resultó en concordancia con los datos publicados previamente (Mani *et al.*, 1998).





## **Capítulo 5: resultados**



## **Primera parte: expresión heteróloga de una versión truncada de la proteína humana $\beta$ -1,4-galactosil-transferasa 7 (B4GALT7) y su caracterización bioquímica**

La proteína galactosiltransferasa I o B4GALT7 ( $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa 7; UDP-galactosa:O- $\beta$ -D-xilosilproteína 4- $\beta$ -D-galactosiltransferasa, EC 2.4.1.133) es, como ya se ha comentado, la GalT implicada en la biosíntesis del tetrasacárido conector de los glicosaminoglicanos, que cataliza la adición del primer residuo de galactosa a la xilosa. Es una proteína conocida y que ha sido previamente clonada en células de insecto (Almeida *et al.*, 1999) y de ratón (Okajima *et al.*, 1999a), lo que permitió su caracterización cinética parcial con extractos de proteína semipura (Almeida *et al.*, 1999) o como una enzima fusionada a la proteína A (Okajima *et al.*, 1999a).

Nuestro propósito ha sido desarrollar un sistema de expresión y purificación más sencillo, basado en la sobre expresión en células bacterianas y purificación en un único paso por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC), una metodología que hemos utilizado en nuestro laboratorio en anteriores ocasiones y que

nos ha reportado fracciones de alta pureza de las enzimas recombinantes en cada caso (Bastida *et al.*, 2003; Sánchez-Moreno *et al.*, 2004; Latorre, 2008).

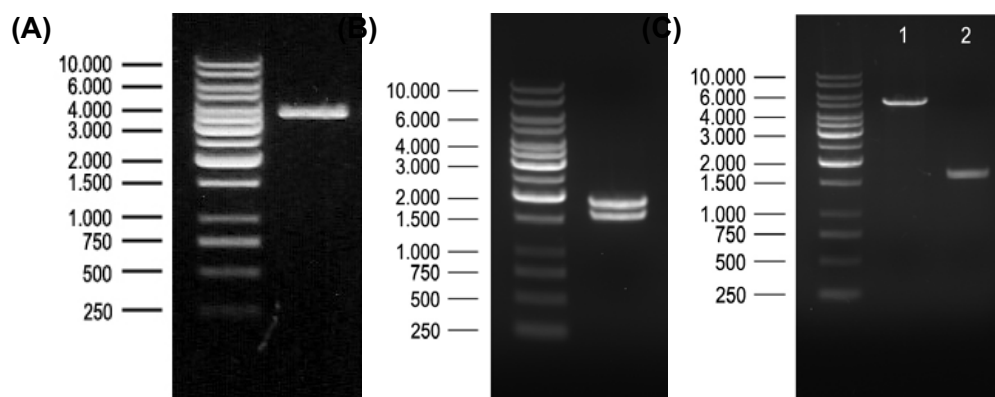
Para ello procedimos a clonar el cDNA del gen B4GALT7 en el vector de expresión pET-28b(+) (5,4 kb). Este plásmido posee varias características que lo hacen idóneo para obtener los objetivos propuestos. Es un plásmido de alto número de copia, con un sistema sencillo de selección por resistencia al antibiótico kanamicina, su promotor proporciona altos niveles de expresión de proteína con una fina regulación y su expresión se dispara por adición de IPTG al medio de cultivo. Además permite obtener una proteína recombinante con un pequeño fragmento fusionado al extremo N-t que codifica para una cola de seis histidinas. Esta cola de histidinas presenta una alta afinidad por los cationes divalentes, lo que permitirá, en un paso posterior, la purificación de la enzima mediante IMAC (Peti y Page, 2007).

Durante la escritura de esta tesis doctoral, han aparecido dos artículos describiendo la clonación de B4GALT7 en *E. coli* siguiendo un enfoque similar al utilizado en nuestro grupo de investigación: la glicosiltransferasa se obtuvo como una proteína de fusión. En ambos trabajos se fusionó B4GALT7 a una proteína de gran tamaño, la proteína de unión a maltosa (MBP) y a la galectina-1, lo que permitió su posterior purificación mediante columnas de afinidad (Daligault *et al.*, 2009; Pasek *et al.*, 2010).

## **Clonación**

El clon IRALp962B203Q2 de la colección RZPD se creció en medio LB con cloranfenicol y se purificó el plásmido p962B203Q2 (~3,5 kb) . Para comprobar el plásmido se procedió a digerirlo con *EcoRI* (resultando un único fragmento de ~3,5 kb) y con *PstI* (resultando dos fragmentos de de ~1,7 y ~1,8 kb). Ambos resultados coinciden con lo esperado (**Figura 19A y B**).

Para clonar el fragmento conteniendo el cDNA de B4GALT7 el plásmido se digirió con *EcoRI* y *XhoI*. El resultado fue una mezcla con dos fragmentos con un tamaño aproximado alrededor de las 1.700 pb. Ante la imposibilidad de separar los dos fragmentos por electroforesis, se optó por ligar la mezcla de dos fragmentos con el



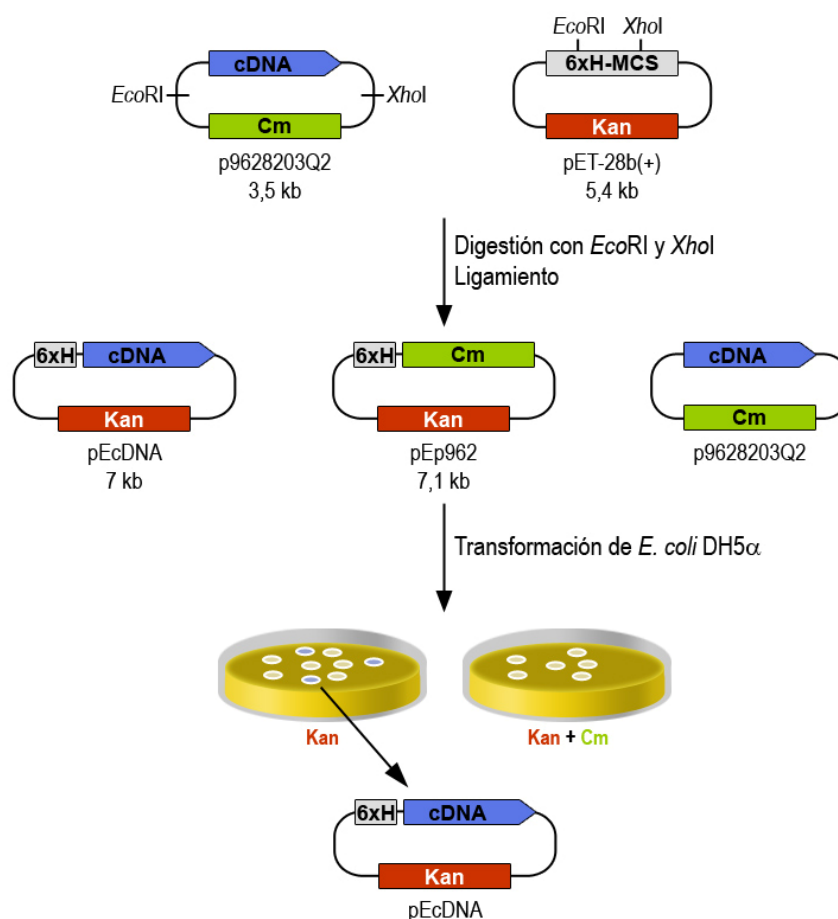
**Figura 19.** Electroforesis con p962B203Q2 digerido con diferentes enzimas de restricción. **(A)** EcoRI (3,5 kb). **(B)** PstI (1,7 + 1,8 kb). **(C)** Los dos fragmentos resultantes de la digestión de p962B203Q2 con EcoRI y XhoI no pudieron separarse por electroforesis, apareciendo como una única banda (carril 2). La mezcla se ligó con el vector pET-28b(+) (5,4 kb) digerido con las mismas enzimas (carril 1).

vector de expresión pET-28b(+), previamente digerido con las mismas enzimas (**Figura 19C**).

Como puede verse en la **Figura 20**, pueden darse tres construcciones distintas. En la primera el fragmento conteniendo el cDNA de B4GALT7 liga con el pET digerido (pEcDNA). La segunda posibilidad era que el fragmento que ligase con el pET fuese el que contiene el gen de resistencia a cloranfenicol (pEp962). Por último, podría darse que los dos fragmentos de p962B203Q2 volviesen a ligar entre ellos.

Con esta mezcla heterogénea se transformó *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los transformantes tenían diferentes fenotipos de resistencia dependiendo de la construcción que hubiesen captado. Las primeras (DH/pEcDNA) presentaban resistencia a kanamicina, las segundas (DH/pEp962) poseían una doble resistencia a kanamicina y cloranfenicol, mientras que las terceras poseían resistencia a cloranfenicol (DH/p962B203Q2). Durante la transformación se sembró en placas con kanamicina, por lo que sólo se seleccionaron las cepas DH/pEcDNA y DH/pEp962.

Para discriminar entre estos dos tipos se procedió a su selección mediante una siembra cruzada en placas con kanamicina y kanamicina/cloranfenicol, se sembraron un total de 25 colonias resultantes de la transformación, recogiendo las que crecieron en presencia de kanamicina pero no en presencia de kanamicina/cloranfenicol (**Figura 20**). De los clones seleccionados se purificó y se secuenció el plásmido

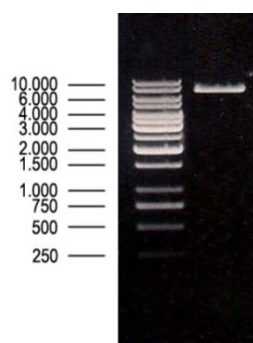


**Figura 20.** Esquema seguido para la clonación del cDNA del gen B4GALT7 en el vector pET-28b(+). El resultado de ligar los fragmentos de la digestión con *EcoRI* y *XhoI* era de tres posibilidades: pEcDNA (resistente a kanamicina), pEp962 (resistente a kanamicina y cloranfenicol) y p962 (resistente a cloranfenicol). Este último se eliminó en el proceso de transformación, ya que se sembró en placas con kanamicina. Para seleccionar los clones con la construcción pEcDNA se realizó posteriormente una siembra cruzada en placas con kanamicina y kanaminica/cloranfenicol. Las colonias que crecían en la placa con kanamicina pero no en la placa con kanamicina y cloranfenicol (representadas en azul) eran las que contenían la construcción pEcDNA (cDNA: cDNA de B4GALT7, 6xH: cola de polihistidinas de pET-28b(+), Kan: gen de resistencia a kanamicina, Cm: gen de resistencia a cloranfenicol).

pEcDNA. Además, se digirió con *EcoRI* para comprobar que el tamaño era el esperado (7 kb, **Figura 21**).

Un análisis de la secuencia del gen B4GALT7<sup>[17]</sup> nos reveló la existencia de varios dominios de interés (**Figura 22**). Es conocido que las glicosiltransferasas de

<sup>[17]</sup> La secuencia puede consultarse en el Gen Bank. El número de entrada es BC007317.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/33873618>) y corresponde al mRNA clonado en Strausberg et al.



**Figura 21.** El plásmido pEcDNA se digirió con *EcoRI* para comprobar que el tamaño coincidía con lo esperado (~7 kb)

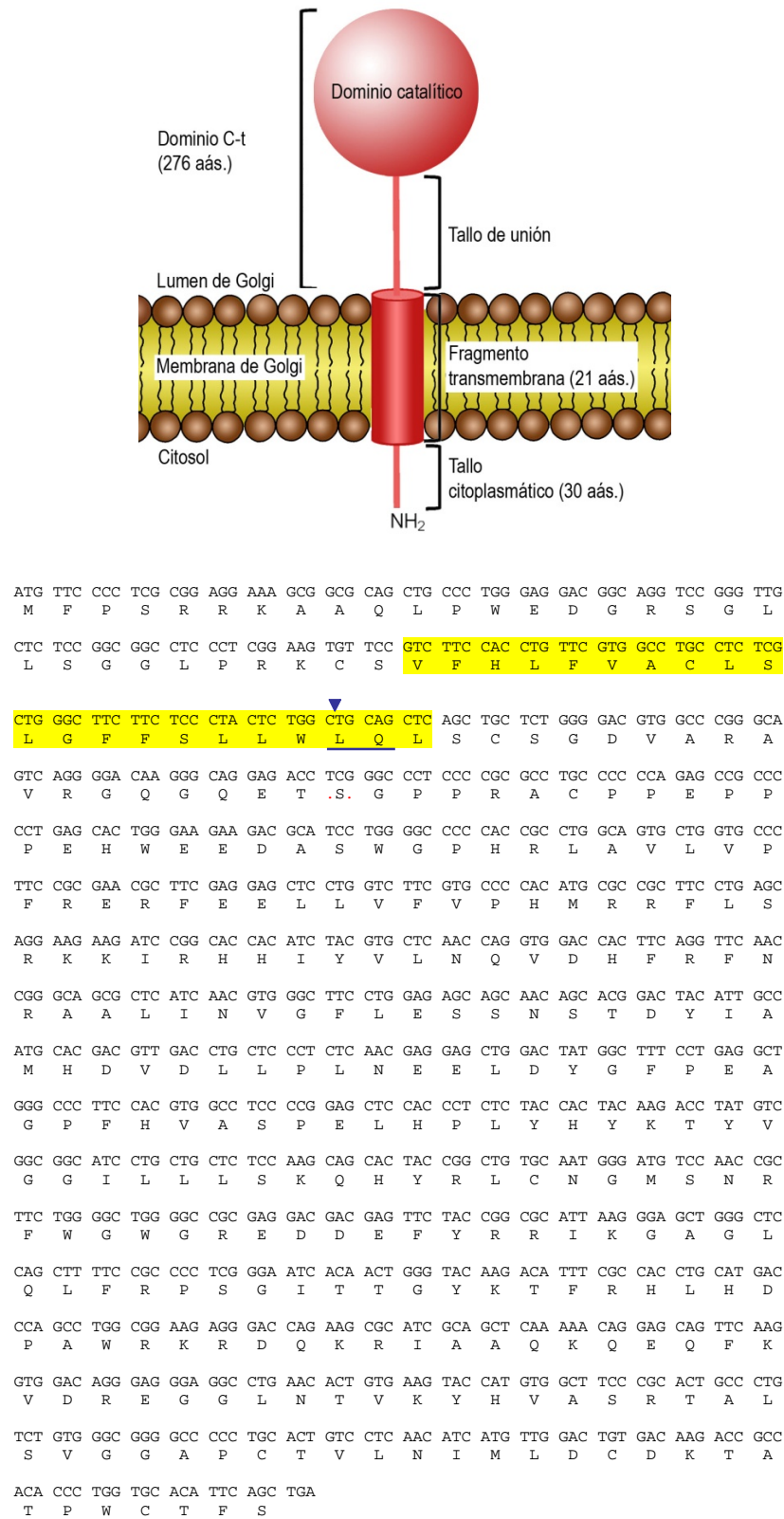
mamíferos en general, y B4GALT7 en particular, son proteínas de membrana de tipo II (Amado *et al.*, 1999), esto es, que se anclan a la membrana celular mediante un fragmento formado por aminoácidos lipófilos. En este caso se pueden diferenciar tres dominios básicos; el dominio N-t con un pequeño tallo citosólico, el fragmento transmembranal y el dominio C-t, formado por un gran dominio globular con la función catalítica más un pequeño tallo de unión no catalítico (Joziasse, 1992).

El expresar este tipo de proteínas en *E. coli* presenta serias dificultades, ya que los fragmentos lipófilos suelen interaccionar entre ellos formando agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión o pueden dar lugar a plegamientos incorrectos de la proteína durante la fase de traducción (Fahnert y Neubauer, 2004). Debido a la dificultad intrínseca para expresar proteínas de membrana en *E. coli*, se siguió una estrategia, frecuente en estos casos, que consiste en eliminar el extremo N-t para obtener dominios solubles y activos de la proteína aprovechando que la actividad catalítica reside en el dominio C-t (Amado *et al.*, 1999). Gracias al programa GREASE (Kyte y Doolittle, 1982) consiguió localizar el fragmento transmembranal entre los aás. 31 y 51, ambos inclusive. Afortunadamente, aguas abajo de la secuencia codificadora del dominio transmembranal existe una diana única de restricción para *PstI* entre los aás. 49 y 50 (**Figura 22**) que permitió obtener una versión truncada de la enzima.

El primer paso para ello fue realizar una digestión del plásmido pEcDNA (purificado de los clones DH/pEcDNA) con *NheI* y *PstI*. En ausencia de dNTPs, la enzima T4 DNA polimerasa tiene un índice de recambio mayor para su actividad exonucleasa 3'→5' que para la actividad polimerasa. En presencia de dNTPs,

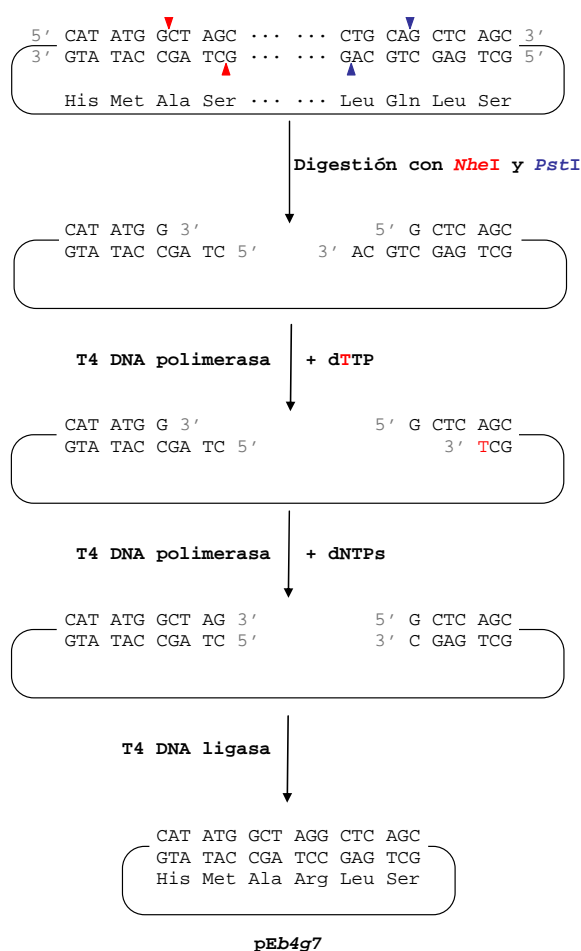
---

(2002), «Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences», Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**: 16899-16903.



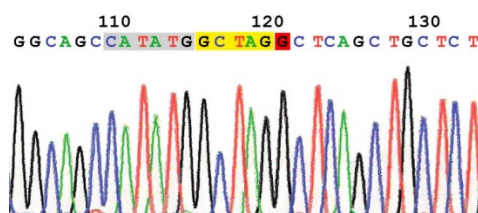
**Figura 22.** Arriba: representación esquemática de la topología de B4GALT7. Debajo: secuencia del gen y de la proteína B4GALT7. El dominio transmembranal aparece en amarillo. El dominio citosólico se encuentra en el extremo N-t, aguas arriba del fragmento transmembranal. Subrayada en azul aparece la secuencia de reconocimiento de *Pst*I, indicando la flecha el punto exacto de corte.





**Figura 23.** Esquema seguido para la obtención de la versión truncada de la proteína B4GALT7. En un primer paso se digirió el plásmido con *PstI* y *NheI*, para después tratarlo con T4 DNA polimerasa en presencia de dTTP. Después, se añadieron el resto de desoxinucleótidos para obtener un plásmido con los extremos romos, que se ligaron con T4 DNA ligasa. Nótese que tras el ligamiento se recuperó la fase de lectura de la proteína.

en cambio, la actividad polimerasa se encuentra favorecida frente a la exonucleasa (Sambrook *et al.*, 1989). Teniendo esto en cuenta el fragmento resultante de la digestión con *NheI* y *PstI* se trató posteriormente con T4 DNA polimerasa en presencia de dTTP, así, se favorece la actividad exonucleasa hasta que la DNA polimerasa se encuentra con una adenina en la cadena complementaria, en ese momento, debido a la presencia de dTTP en el medio, la actividad polimerasa gana frente a la exonucleasa. Como consecuencia, se pudo generar un extremo 3'OH susceptible de ser utilizado por la DNA polimerasa como iniciador en el extremo cortado con *PstI*, quedando un plásmido con extremos cohesivos no complementarios (**Figura 23**). Para conseguir un plásmido con extremos romos se procedió a tratar con



**Figura 24.** Secuenciación de pEb4g7. En amarillo aparecen los restos de la diana para *NheI* y en rojo los de *PstI*, después de la digestión y el tratamiento con la T4 DNA Polimerasa.

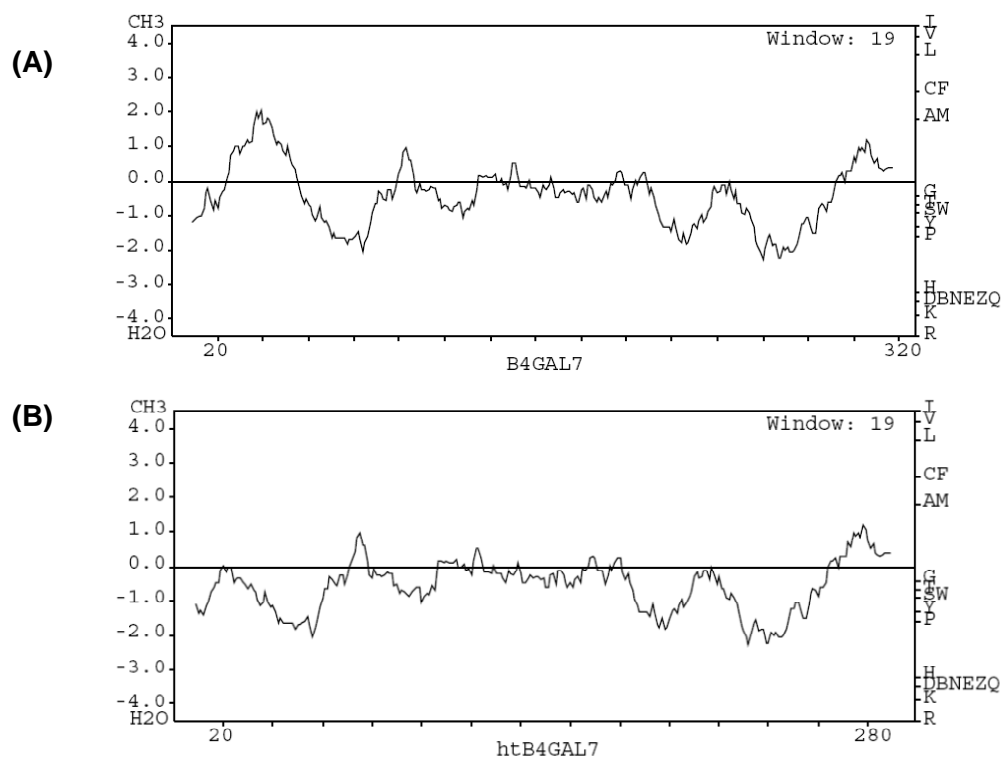
T4 DNA polimerasa pero esta vez en presencia de los cuatro dNTPs. El último paso consistió en incubar el plásmido con T4 DNA ligasa. Así se ligaron ambos extremos para obtener la construcción pEb4g7 (6,7 kb) (**Figura 23**).

El vector pEb4g7 se utilizó para transformar la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* obteniendo así los clones BL/pEb4g7. Los clones se crecieron en medio LB con kanamicina y los plásmidos se purificaron mediante *miniprep*. Para llevar a cabo el análisis de restricción se digirieron con *XhoI* y *XhoI* + *NcoI*. El primer caso nos dio un fragmento de aproximadamente 6,5 kb. En el segundo caso aparecieron dos fragmentos, uno de alrededor de 1.500 pb y otro de 5 kb. Los resultados coincidieron con lo esperado. Además el plásmido se secuenció utilizando el promotor T7 para comprobar que la fase de lectura era correcta (**Figura 24**).

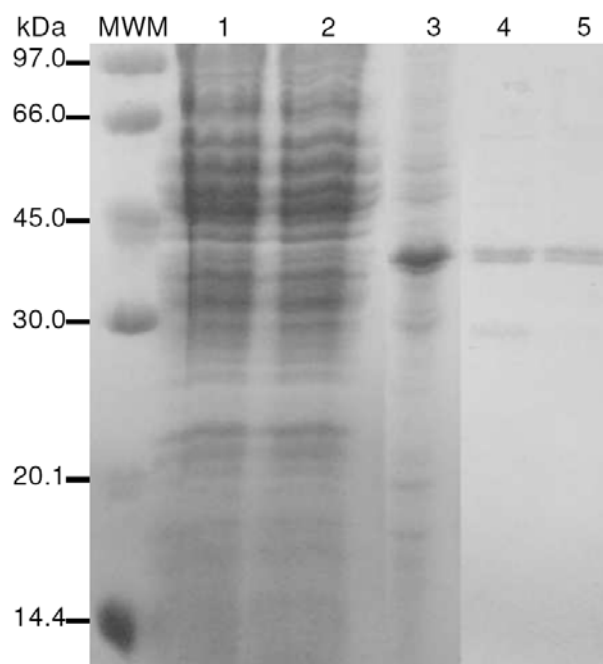
La secuencia de la nueva proteína generada se cargó en el programa GREASE (Kyte y Doolittle, 1982), obteniéndose un perfil de hidrofobia que concuerda con el de una proteína soluble. En la **Figura 25** aparecen comparados los perfiles de hidrofobia de las dos construcciones, antes y después de eliminar el fragmento transmembranal. Puede observarse como la zona hidrófoba del extremo N-t desaparece de la nueva proteína.

### ***Sobreexpresión y purificación***

Una vez seguros de que se disponía de la secuencia correcta, se procedió a la sobreexpresión de la proteína B4GALT7, utilizando el promotor de expresión T7 inducible mediante IPTG, tal y como aparece recogido en la parte experimental. La proteína se purificó en un solo paso mediante IMAC, obteniéndose en un alto grado de pureza (>98 %). En la **Figura 26** se muestra un gel de electroforesis con el CFE



**Figura 25.** Comparación entre los perfiles de hidrofobia calculados con el programa GREASE para las proteínas nativa **(A)** y modificada **(B)**.



**Figura 26.** Purificación por IMAC de B4GALT7 humana expresada en *E. coli*. Los carriles 1 y 2 corresponden con el CFE antes y después, respectivamente, de pasar por la columna. El carril 3 corresponde con la resina cargada con el CFE. Los carriles 4 y 5 corresponden a diferentes fracciones de proteína pura (puede verse alguna impureza en el carril 4). El monómero recombinante tiene un peso molecular de 34,3 kDa.

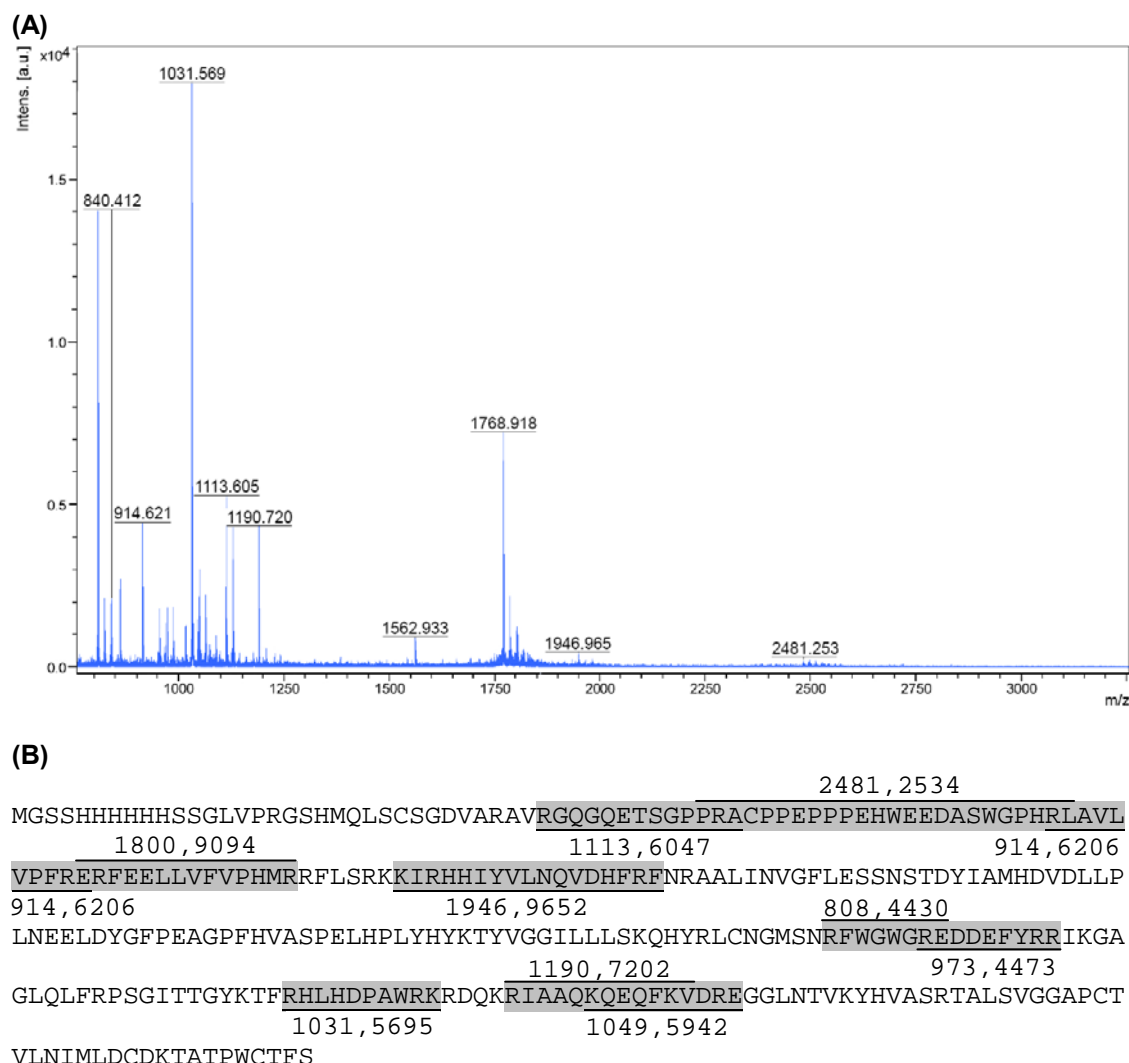
(carril 1) y muestras purificadas tras su paso por la columna de níquel-agarosa (carriles 4-5). Aunque el grado de expresión que muestra el CFE no es muy alto (en torno al 10 % del total de la proteína soluble) se consiguió concentrar la proteína (>90 %) tras pasar el extracto por la resina de níquel (carril 3). Eluyendo con concentraciones de imidazol entre 250 y 500 mM se consiguieron extractos muy puros de proteína (carriles 4 y 5, respectivamente). Para eliminar el imidazol se sometió a las muestras a diálisis frente a H<sub>2</sub>O mili-Q. Las muestras se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -80 °C. El rendimiento global fue de 5 mg de proteína recombinante/L de cultivo.

Para comprobar la identidad de la proteína se determinó su huella peptídica en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC. Para ello se realizó una electroforesis de una muestra de proteína purificada por IMAC. La banda correspondiente a la proteína fue cortada del gel y digerida con tripsina a 37 °C O/N. La huella peptídica se generó mediante MALDI-TOF en el rango  $m/z = 800-3600$  de los péptidos generados tras la digestión con el enzima. La comparación de la secuencia de estos péptidos con las bases de datos fue realizada con el programa MASCOT (Perkins *et al.*, 1999).

La huella peptídica de la proteína recombinante permitió la identificación de nueve péptidos correspondientes a la secuencia de la B4GALT7 presente en las bases de datos (**Figura 27**), quedando, no obstante, un número de péptidos sin asignar. Decidimos enfrentar las masas sin asignar a la secuencia conocida de B4GALT7 utilizando la herramienta FindMod de Expasy,<sup>[18]</sup> que permite comparar las masas de los péptidos obtenidas experimentalmente con las masas de los péptidos calculados por el programa para una secuencia teórica introducida. Así, se pudo comprobar que uno de esos péptidos (de  $m/z$  1800,9094) correspondía con la secuencia ERFEELLVFVPHMR de B4GALT7. Por otro lado, aunque la huella peptídica no reconoce la secuencia inicial de la cola de poli histidinas, ésta se ha comprobado mediante secuenciación de DNA, como se describe más arriba en esta memoria.

---

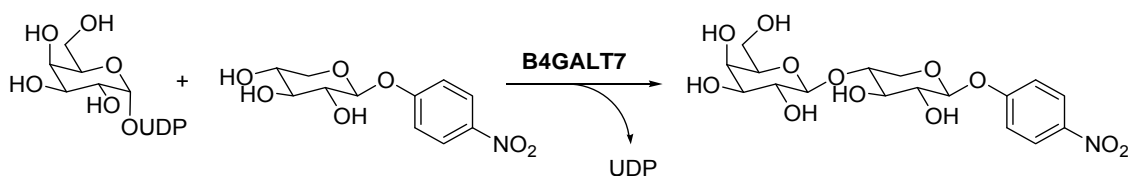
<sup>18</sup> Disponible en el acceso en línea <http://www.expasy.ch/tools/findmod>.



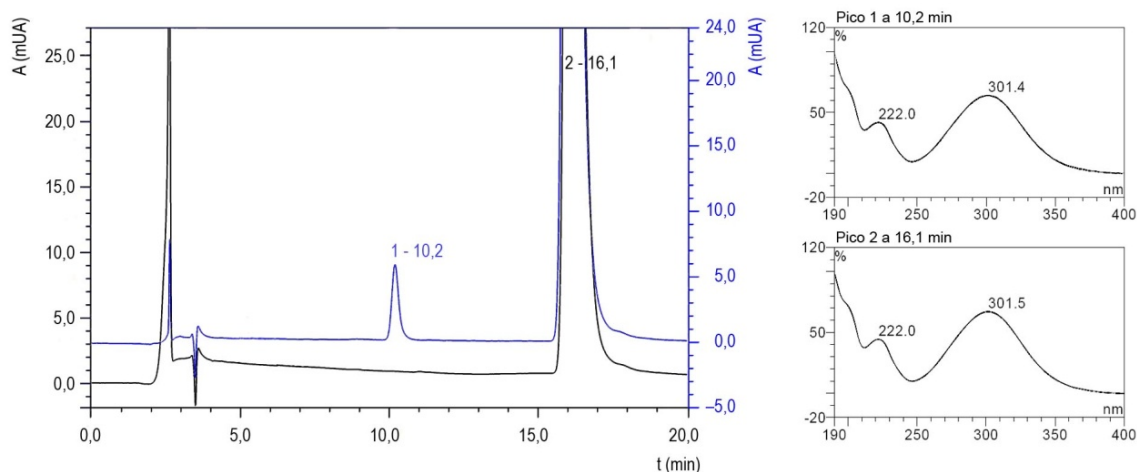
**Figura 27.** Huella peptídica de la B4GALT7. **(A)** Cromatograma de la huella peptídica. **(B)** Secuencia de la B4GALT7, en la que se muestran sombreados los péptidos identificados en el análisis. El péptido de  $m/z$  1800,9094 (que solapa parcialmente con el de  $m/z$  914,6206) fue identificado mediante la herramienta FindMod de ExPASy.

### Caracterización bioquímica de la enzima B4GALT7

Con las fracciones de proteína pura se procedió a realizar su caracterización cinética. El esquema de reacción se muestra en la **Figura 28**: como puede apreciarse, se utilizó la UDP-Gal como sustrato donador de grupos glicosilo, que es el sustrato natural para todas las GalT humanas descritas (Amado *et al.*, 1999; Hennes, 2002). Como sustrato aceptor se utilizó el  $p$ -Nph- $\beta$ -D-Xyl (1), que ha sido descrito como tal en la bibliografía (Schwartz *et al.*, 1974b; Almeida *et al.*, 1999; Okajima *et al.*, 1999a).



**Figura 28.** Reacción catalizada *in vitro* por la B4GALT7.



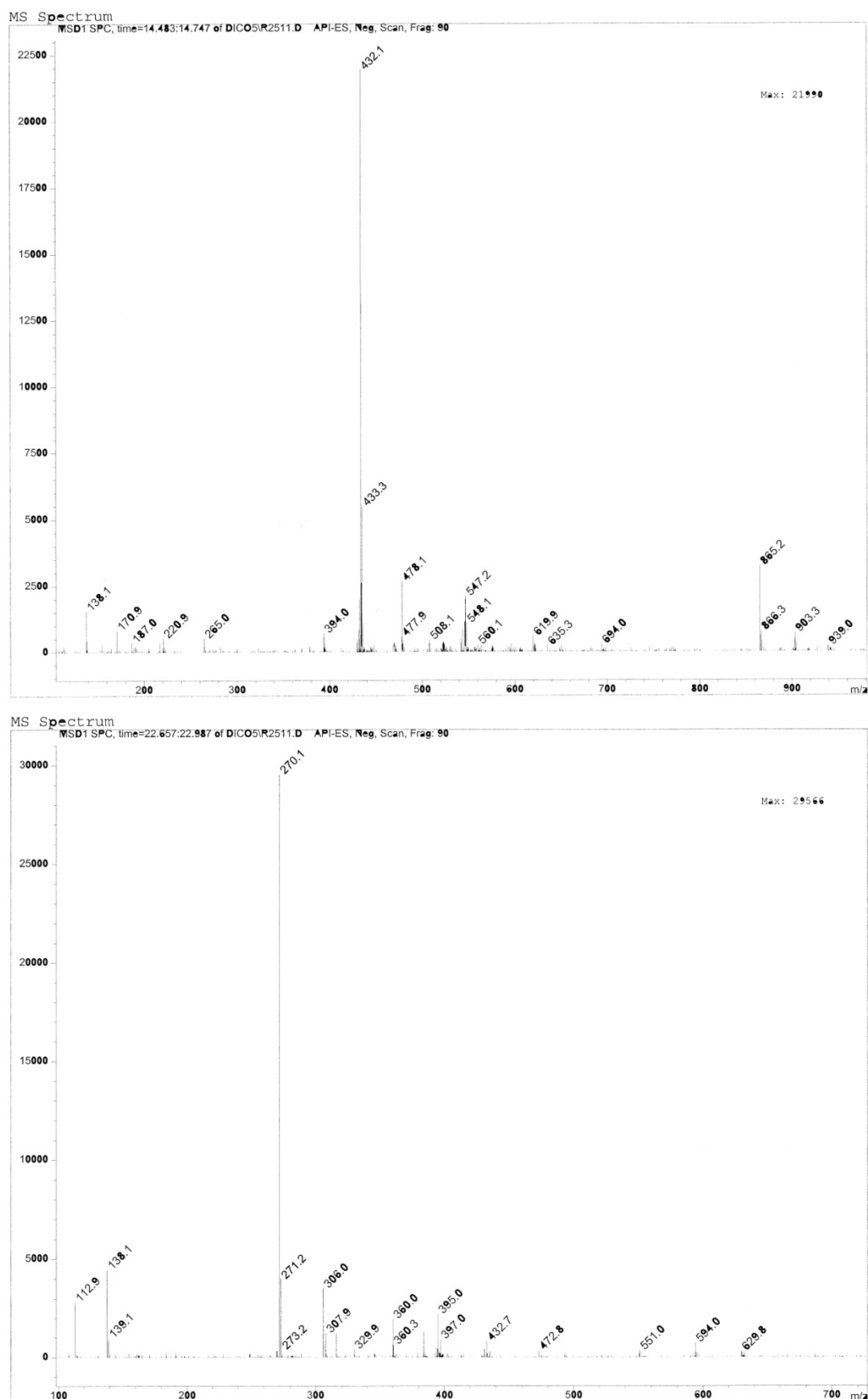
**Figura 29. (A)** Cromatograma correspondiente a diferentes tiempos de reacción. Al tiempo de reacción de 1 h (azul) se observa la aparición de un pico a 10,2 min (pico 1), que no aparece a tiempos iniciales de reacción (negro). **(B)** Los espectros de emisión del pico 1 (10,2 min) y del pico 2 (*p*-Nph- $\beta$ -D-Xyl; 16,1 min) son idénticos, observándose su máximo de absorción en el rango visible a 300 nm.

Además, este compuesto contiene un cromóforo con un máximo de absorbancia a 300 nm, lo que facilita el seguimiento de la reacción por HPLC (**Figura 29B**).

Se realizó una primera prueba de reacción con 500  $\mu$ M de **1** y 200  $\mu$ M de UDP-Gal, concentraciones similares a las recogidas en la literatura (Lugemwa *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 1999). Mediante HPLC (tal y como se ha descrito en el capítulo de «materiales y métodos») se detectó la aparición de un nuevo pico con tiempo de retención de 10,2 min y que aumentaba con el tiempo de reacción (**Figura 29A**).

El pico resultante se analizó mediante HPLC-masas, confirmándose una masa de  $m/z$  432,1 ( $M-H^+$ ), que se corresponde con la del disacárido D-Gal- $\beta$ (1,4)-D-Xyl- $\beta$ (1,0)-*p*-Nph esperado (**Figura 30**).

Estos resultados indican que la proteína expresada y purificada en *E. coli* es funcionalmente activa. Como ya se ha comentado, durante la escritura de esta tesis, se han publicado dos artículos describiendo la clonación de B4GALT7 en *E. coli*



**Figura 30.** Espectros de HPLC-masas para los picos 1 (arriba) y 2 (abajo). Las masas observadas coinciden con los resultados esperados para el disacárido ( $m/z$  432,1;  $M-H^+$ ) y el  $p$ -Nph- $\beta$ -D-Xyl ( $m/z$  270,1;  $M-H^+$ ), respectivamente.

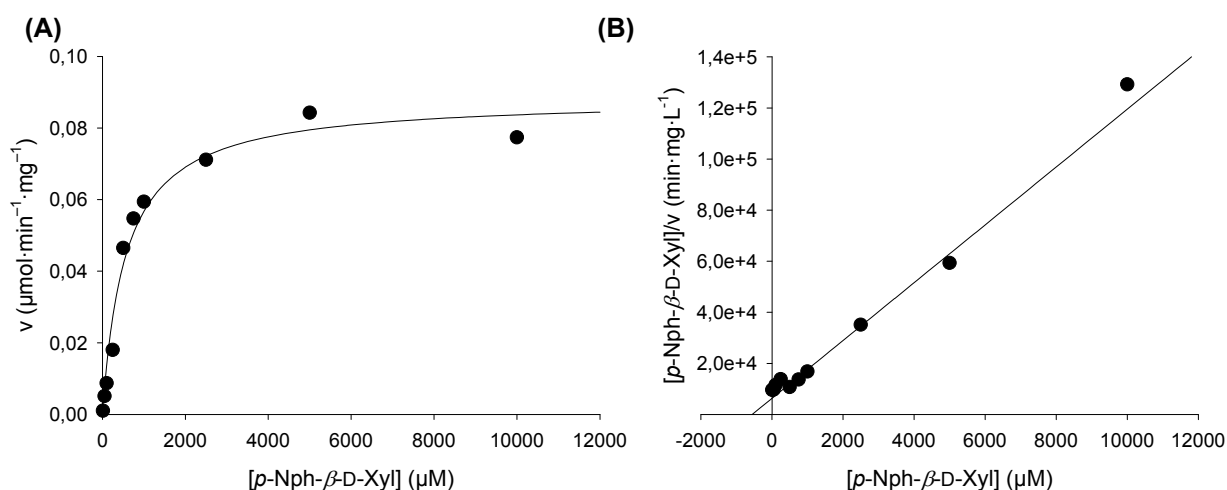
(Daligault *et al.*, 2009; Pasek *et al.*, 2010), pero hasta ese momento, la enzima sólo se había clonado en células de insecto (Almeida *et al.*, 1999), de ratón (Okajima *et al.*, 1999a, 1999b) o levaduras (Gulberti *et al.*, 2005). Al fusionar B4GALT7 a una proteína de gran tamaño como MBP (Daligault *et al.*, 2009; Parsek *et al.*, 2010) o galectina-1 (Parsek *et al.*, 2010) se consigue aumentar la solubilidad de la proteína de fusión aumentando las posibilidades de que esta se pliegue de forma activa (Bach *et al.*, 2001; Esposito y Chatterjee, 2006). Los resultados descritos en esta memoria muestran que la proteína se expresó en *E. coli* de forma activa sin necesidad de fusionarla a grandes proteínas.

### Medida de los parámetros cinéticos para *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl (1) y UDP-Gal

Comprobada ya la identidad de la enzima, el siguiente paso fue su caracterización cinética. Para la determinación de las constantes cinéticas aparentes se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten (**ec. 1**) y sus derivaciones para la representación lineal de los datos de velocidad.

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad [1]$$

Los experimentos se realizaron variando un único sustrato (aceptor o donador) y manteniendo el otro a concentración constante y saturante.



**Figura 31.** Cinéticas de la proteína B4GALT7 respecto a *p*-Nph- $\beta$ -D-Xyl (1) (A): representación de Michaelis-Menten, obtenida con un ajuste no lineal. (B): representación de Hanes-Woolf, obtenida mediante un ajuste lineal. Se utilizaron los ajustes no lineales frente a los lineales.



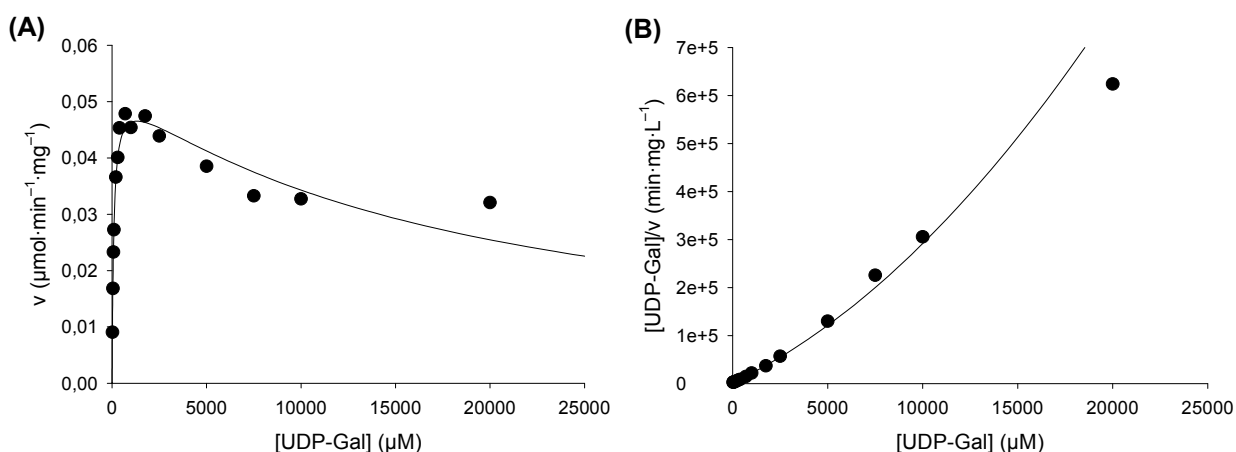
Los datos para el aceptor **1** se ajustaron a la **ec. 1** mediante un ajuste no lineal con el módulo SigmaPlot Enzyme Kinetics 1.1 del programa SigmaPlot 8.0. Los parámetros cinéticos muestran un comportamiento de Michaelis-Menten con una  $K_M$  aparente de 0,59 mM y una  $k_{cat}$  de 49,78 s<sup>-1</sup>, obteniéndose una eficiencia catalítica de  $8,5 \times 10^4$  s<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup> (**Figura 31**).

En el caso de la UDP-Gal los resultados no se ajustaron a una cinética michaeliana, observándose un fenómeno de inhibición por exceso de sustrato cuando la concentración de éste era superior a 1,25 mM (**Figura 32**). Para el ajuste de estos datos se aplicó la ecuación 2 (**ec. 2**):

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)} \quad [2]$$

donde  $[S]$  corresponde a la concentración de UDP-Gal y  $K_i$  es la constante aparente de inhibición por exceso de sustrato.

Los valores cinéticos calculados fueron  $K_M$  aparente de 92 µM, una  $k_{cat}$  de 51,36 s<sup>-1</sup> ( $k_{cat}/K_M$  de  $5,6 \times 10^5$  s<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup>) y una  $K_i$  de 21,1 mM. Este efecto de inhibición por exceso de sustrato de la UDP-Gal ha sido descrito también para la proteína de fusión galectina 1-B4GALT7 (Parsek *et al.*, 2010), aunque la inhibición en este caso fue mucho menor ( $K_i$  de 5,6 mM frente a 21,1 mM).



**Figura 32.** Cinéticas de la proteína B4GALT7 respecto a UDP-Gal. **(A):** representación de Michaelis-Menten, en la que se observa que la gráfica se desvía de la forma hiperbólica estándar mostrando un efecto de inhibición por exceso de sustrato. **(B):** representación de Hanes-Woolf, donde se observa el ajuste parabólico correspondiente a una inhibición por exceso de sustrato.

**Tabla 13.** Comparación de los valores cinéticos obtenidos en la literatura para B4GALT7 humana. Se indica si la proteína recombinante fue obtenida como proteína de fusión y si ha sido o no purificada.

Proteína de fusión	$K_{M,A}^{[a]}$ (mM)	$K_{M,D}^{[b]}$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	Purif.	Referencia
Cola de histidinas	0,59 (1)	0,09	49,78	sí	esta memoria
MBP	1,27 (1) 0,27 (MU-Xyl)	0,23	1,5 1,2	sí	Daligault <i>et al.</i> , 2009
Galectina 1	16 (Xyl)	0,52	0,62	sí	Parsek <i>et al.</i> , 2010
No (silvestre)	0,85 (1) 0,16 (MU-Xyl)	0,31	n. d.	no	Daligault <i>et al.</i> , 2009
No (silvestre)	0,89 (MU-Xyl)	0,06	n. d.	no	Almeida <i>et al.</i> , 1999
Proteína A	n. d. (1)	n. d.	n. d.	no	Okajima <i>et al.</i> , 1999
No (silvestre)	3,4 (Xyl-Ser)	0,17	n. d.	no	Quentin <i>et al.</i> , 1990
No (silvestre)	n. d. (Xyl)	0,05	n. d.	no	Schwartz y Rodén, 1975
No (silvestre)	n. d. (Xyl) n. d. (S.E.)	0,1 0,2	n. d.	no	Helting y Rodén, 1969

<sup>[a]</sup>  $K_{M,A}$ :  $K_M$  para el sustrato aceptor. Se indica entre paréntesis el sustrato aceptor utilizado en cada caso (MU-Xyl, metil-umbelifenil  $\beta$ -D-xilopiranosido; S.E., sustrato endógeno —PG parcialmente degradado—).

<sup>[b]</sup>  $K_{M,D}$ :  $K_M$  para el sustrato donador (UDP-Gal).

Los valores de  $K_M$  obtenidos para el sustrato aceptor (0,59 mM) y donador (0,09 mM) son comparables a los descritos previamente, que aparecen recogidos en la **Tabla 13**. Daligault *et al.* (2009) dan unos valores de 0,23 mM (UDP-Gal) y 1,27 mM (1) para la enzima de fusión MBP-B4GALT7 y de 0,31 y 0,85 mM para extractos homogeneizados de la enzima silvestre expresada en células HeLa. Otros valores publicados para UDP-Gal son de 0,52 mM (Parker *et al.*, 2010); 0,05 mM (Schwartz y Rodén, 1975) y 0,1 mM (Helting y Rodén, 1969) utilizando xilosa como aceptor y 0,2 mM utilizando como sustrato aceptor un PG endógeno degradado parcialmente (Helting y Rodén, 1969). En el caso de la  $k_{cat}$  sí que aparecen diferencias significativas: la constante calculada es 30 veces mayor que la descrita por Daligault *et al.* (2009) para el mismo par de compuestos (1,5 s<sup>-1</sup> frente a 50 s<sup>-1</sup>). Estas diferencias podrían deberse a una pérdida entrópica en el centro activo de la construcción MBP-B4GALT7, aunque no debería descartarse que, siendo constantes aparentes, las diferencias se debiesen a las distintas condiciones de reacción utilizadas en los ensayos enzimáticos. Por ejemplo, mientras que nuestros ensayos se realizaron a pH 5,0 y t. a., Daligault *et al.* (2009) los realizaron a pH 7,0 y 37 °C.

**Tabla 14.** Cálculos de las constantes cinéticas para los aceptores y dadores testados con B4GALT7.

	Compuesto	$V_{rel}$ (%)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )
Aceptores	<i>p</i> -Nph-β-D-Xyl	100	0,59	49,78	8,5 x 10 <sup>4</sup>
	<i>p</i> -Nph-α-D-Xyl	5	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>p</i> -Nph-β-L-Fuc	0	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>p</i> -Nph-β-D-Gal	0	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>p</i> -Nph-β-D-Glc	0	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>p</i> -Nph-α-D-Glc	0	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>p</i> -Nph-β-D-Man	0	n. d.	n. d.	n. d.
Dadores	UDP-Gal <sup>[a]</sup>	100	0,09	51,36	5,6 x 10 <sup>5</sup>
	UDP-Glc	3,2	0,18	1,59	8,8 x 10 <sup>3</sup>
	GDP-Fuc	0	n. d.	n. d.	n. d.
	CMP-NeuAc	0	n. d.	n. d.	n. d.

<sup>[a]</sup> Para UDP-Gal existe inhibición por exceso de sustrato, con una  $K_{is}$  de 21,1 mM.

## Estudios de especificidad de sustrato

Una de las características de las glicosiltransferasas de la ruta de Leloir, esto es, las que utilizan azúcares nucleótido como sustratos donadores (Leloir, 1972), es su alta especificidad de sustrato, tanto para el dador como para el aceptor, lo que llevó a formular el paradigma «un enzima, un enlace»: aún en ausencia de moldes, la estéreo y regioespecificidad de los enlaces formados aseguraba la fidelidad de las estructuras sintetizadas *in vivo* por estas glicosiltransferasas (Hagopian y Eylar, 1968). Este paradigma cambió con el paso de los años; entre otros aspectos, la investigación en glicosiltransferasas puso de manifiesto que las especificidades *in vitro* de estas proteínas no eran tan rígidas como se creyó en un principio. En general, la especificidad por los sustratos dadores (el azúcar nucleótido) es bastante restringida, pero la especificidad por los aceptores es más laxa (Wong y Whitesides, 1994). Para determinar la especificidad de sustrato de B4GALT7 se utilizaron diferentes compuestos, tanto aceptores como donadores (**Tabla 14**).

Como sustratos donadores, se probaron los azúcares nucleótidos UDP-glucosa (UDP-Glc), GDP-fucosa (GDP-Fuc) y CMP-ácido *N*-acetil-neuramínico (CMP-NeuAc). Sólo la UDP-Glc mostró una actividad relativa del 3,2 % frente a UDP-Gal (**Tabla 14**).

Los datos coinciden con lo publicado previamente para B4GALT7 (Daligault *et al.*, 2009) y coinciden con la especificidad mostrada por otras  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasas, que pueden utilizar diferentes UDP-azúcares como donadores a bajas velocidades (Wong y Whitesides, 1994).

En cuanto al aceptor, se probaron diferentes configuraciones en el anillo de azúcar (*p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-xilopiranosido, *p*-nitrofenil  $\beta$ -L-fucopiranosido, *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido, *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-manopiranosido, *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido y *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido). De todos ellos, sólo el *p*-Nph- $\alpha$ -D-Xyl mostró actividad frente a la enzima con una velocidad relativa del 5 % frente a *p*-Nph- $\beta$ -D-Xyl. Ningún otro aceptor mostró actividad con la proteína (**Tabla 14**). Estos datos concuerdan con lo publicado en la literatura, en los que se describe que B4GALT7 puede actuar pobremente sobre  $\alpha$ -xilopiranosidos y no reconoce configuraciones de  $\beta$ -GlcNAc,  $\beta$ -Glc,  $\beta$ -Gal o  $\beta$ -GalNAc en el anillo aceptor (Freeze *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1999; Okajima *et al.*, 1999a). La falta de actividad sobre residuos de Glc (en su configuración anomérica tanto  $\alpha$  como  $\beta$ ) nos muestra que la enzima no acepta este tipo de sustituyente en el C-5 del anillo de azúcar, ya que la secuencia configuracional del anillo es igual a la de la xilosa, diferenciándose únicamente de la sustitución en C-5 con un hidroximetilo ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), lo que explica la falta de resultados positivos con Fuc o Gal. Para estos últimos, además, la configuración axial del hidroxilo-4 impide la acción enzimática; es indispensable que el OH se encuentre ecuatorial en el anillo (Lugemwa *et al.*, 1996). Esta ausencia de actividad sobre residuos de Glc o GlcNAc contrasta con el resto de miembros de la familia de las  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasas. Los otros seis miembros (B4GALT1-6) presentan actividad frente a diferentes *N*- y *O*-glicanos que poseen grupos de GlcNAc y, además, al interaccionar con la  $\alpha$ -lactalbúmina B4GALT1, 2, 5 y 6 reconocen residuos de Glc (Amado *et al.*, 1999; Hennet, 2002). Además, B4GALT1, el miembro mejor estudiado de la familia, puede actuar *in vitro* sobre a NeuAc y derivados de GlcNAc y Xyl (Wong y Whitesides, 1994) e *in vivo* es capaz de utilizar Fuc como aceptor en algunos *O*-glicanos (Hennet, 2002).

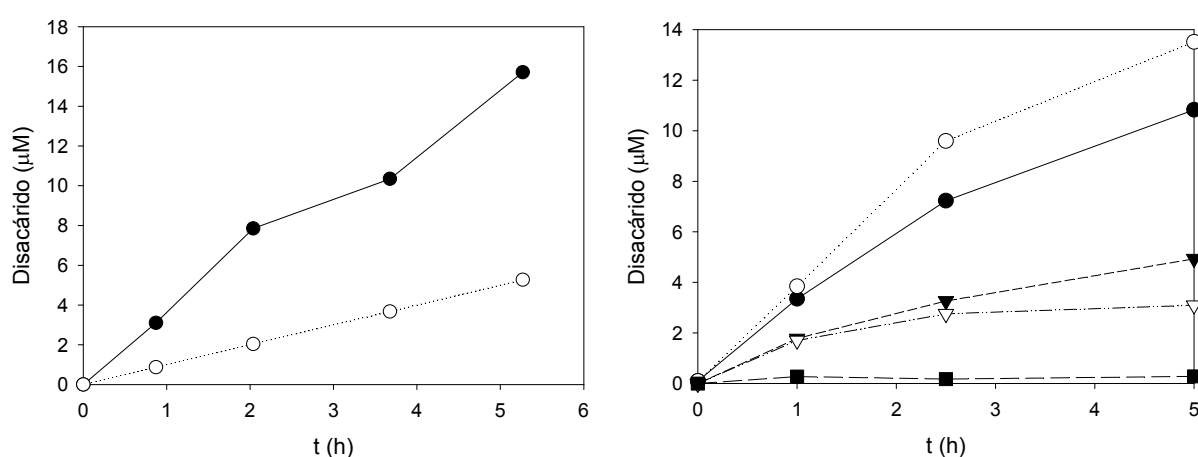
### **Estudio del efecto de diferentes cationes divalentes en la actividad de la enzima B4GALT7 recombinante**

Las glicosiltransferasas de tipo Leloir son enzimas dependientes de cationes divalentes (Powell y Brew, 1976). Estos cationes participan estabilizando la unión del

azúcar nucleótido al centro activo del enzima durante la transferencia del grupo glicosilo (Rini *et al.*, 2009). Son, por tanto, esenciales para la actividad enzimática.

Entre los cationes divalentes más habituales se encuentran el  $Mn^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$ . Se hicieron pruebas de actividad, a concentración saturante de UDP-Gal y **1**, con estos dos iones a una concentración final de 20 mM y se analizó la cantidad de disacárido Gal-Xyl-O-*p*-Nph formado a distintos tiempos de reacción. Se comprobó que, a la concentración indicada, el  $Mn^{2+}$  confería 2,4 veces más actividad a B4GALT7 que el  $Mg^{2+}$  (**Figura 33A**), lo que coincide con lo publicado en la literatura (Robinson *et al.*, 1966).

Después se realizó un ensayo para optimizar la concentración de  $Mn^{2+}$ . Para ello se midió la actividad de la enzima a varias concentraciones de  $Mn^{2+}$ . Al igual que en los experimentos anteriores, las reacciones se hicieron con concentración saturante de los sustratos UDP-Gal y **1**. Los mejores resultados se dieron a una concentración de  $Mn^{2+}$  de 20 mM. A concentraciones superiores se produjo una pérdida dramática de actividad, llegando a perder hasta el 98 % a la concentración de 400 mM (**Figura 33B**). Los datos coinciden con lo publicado en la literatura, donde se utilizan concentraciones de  $Mn^{2+}$  entre 15 y 20 mM y el aumento de la concentración de  $Mn^{2+}$  por encima de estos valores se relaciona con la caída de actividad enzimática (Robinson *et al.*, 1966) y la formación de subproductos de reacción no identificados (Helting y Rodén, 1969).

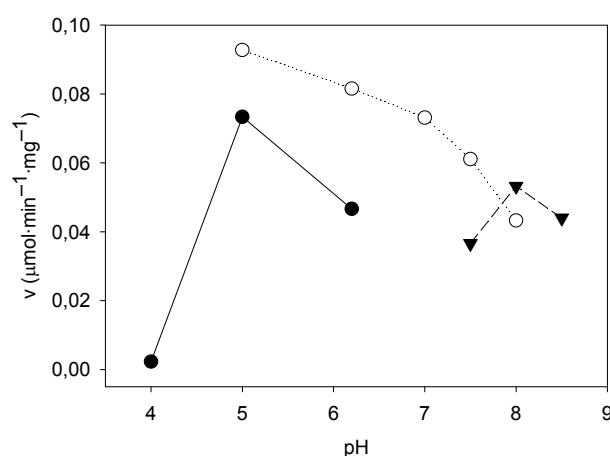


**Figura 33. (A)** Comparación de la producción de Gal-Xyl-O-*p*-Nph en presencia de  $Mn^{2+}$  (●) y  $Mg^{2+}$  (○). **(B)** Optimización de la cantidad de  $Mn^{2+}$ . Se realizaron pruebas de producción del disacárido Gal-Xyl-O-*p*-Nph a diferentes concentraciones de  $MnCl_2$ : 10 (●), 20 (○), 50 (▼), 100 (△) y 400 mM (■).

## Estudios para el cálculo del pH óptimo

Para calcular el pH óptimo de actuación de la B4GALT7 se realizaron reacciones a diferentes pH. Para cada rango de pH se eligieron diferentes tampones, utilizándose el acético/acetato para pH entre 4 y 6, el fosfato en el entorno 5 y 7,5 y Tris/HCl para pH de 7,5-8,5. Las reacciones se realizaron con concentración saturante de *p*-Nph- $\beta$ -D-Xyl y UDP-Gal. Para mantener una fuerza iónica constante de 154 mM, se adicionaron diferentes cantidades de NaCl al medio de reacción. El resultado se observa en la **Figura 34**, apreciándose un máximo en actividad a pH 5,0 con tampón fosfato 20 mM. El pico coincide con otro máximo relativo al mismo pH utilizando el tampón acético/acetato 20 mM.

Respecto al pH óptimo de B4GALT7 en la literatura, existen ciertas discrepancias que podrían deberse a las diferencias metodológicas empleadas en cada caso. Al estudiar la actividad B4GALT7 en extractos de cartílago y cerebro de embrión de pollo, el pH óptimo para la reacción se cifró en 5,3 (Helting y Rodén, 1969), en concordancia con el valor de 5,5 obtenido previamente (Robinson *et al.*, 1966) y que encaja con el pH obtenido en esta memoria. Con la proteína humana se han obtenido valores de 6,5 midiendo la actividad en extractos de membrana con B4GALT7, el mismo valor que para la enzima homóloga de *D. melanogaster* (Nakamura *et al.*, 2002), y de 6,0 midiendo en extractos celulares de B4GALT7 soluble (Quentin *et al.*, 1990). En todo caso, el pH óptimo está siempre comprendido entre 5,0 y 6,5 lo que concuerda con la localización de B4GALT7 en el aparato de Golgi (Sugumaran y Silbert, 1991; Vadaie *et al.*, 2002), donde el pH medio es de 5,9-6,45 (Llopis *et al.*, 1998).



**Figura 34.** Perfil de actividad de B4GALT7 a diferentes valores de pH y con distintos tampones, acético/acetato (●), fosfato (○) y Tris-HCl (▼).

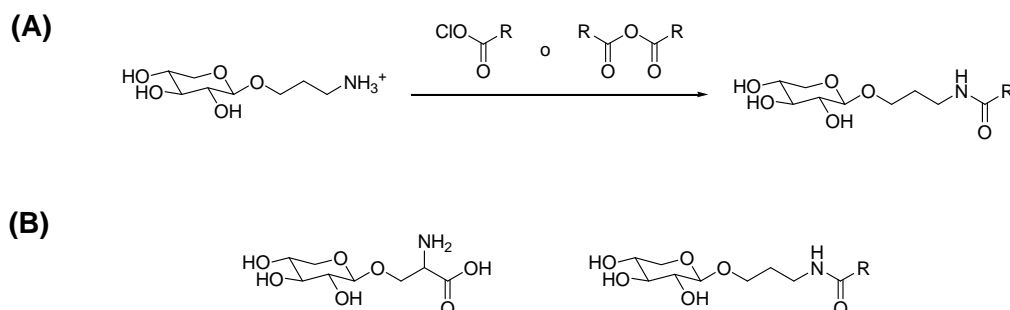
## Segunda parte: síntesis de diferentes xilopiranósidos

Las células inician la biosíntesis de GAG transfiriendo un residuo de xilosa a una serina de la proteína que formará los PG. Como ya se ha comentado en la introducción, las células son capaces de iniciar el proceso de síntesis de GAG sin necesidad de este paso previo utilizando  $\beta$ -D-xilósidos sintéticos con aglicones hidrófobos (como por ejemplo grupos bencilo, *p*-nitrofenilo, naftilo, etc.) que permiten al carbohidrato entrar en las células por un mecanismo de difusión pasiva (Fritz *et al.*, 1994a; Sarkar *et al.*, 1995). Así, añadiendo estos compuestos a un medio de cultivo, las células pueden sintetizar GAGs artificiales utilizando los xilopiranósidos como iniciadores, resultando en la secreción al medio de los GAG formados (Johnston y Meller, 1979).

En base a esto, uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido el diseño nuevos xilopiranósidos con aglicones hidrófobos que sirvan como aceptores para la B4GALT7, de forma que más adelante puedan ser testados como agentes anticancerígenos (Mani *et al.*, 2004).

### Síntesis de xilopiranósidos con grupo amido en el aglicón

Se ha desarrollado un método eficiente para la obtención de 3-amidopropil xilopiranósidos con distintos sustituyentes **R** en el aglicón (**Figura 35A**), mediante la formación de un enlace amido entre el sustituyente y el fragmento aglicónico de 3-aminopropanol. En estos xilopiranósidos, el grupo funcional amido podría mimetizar

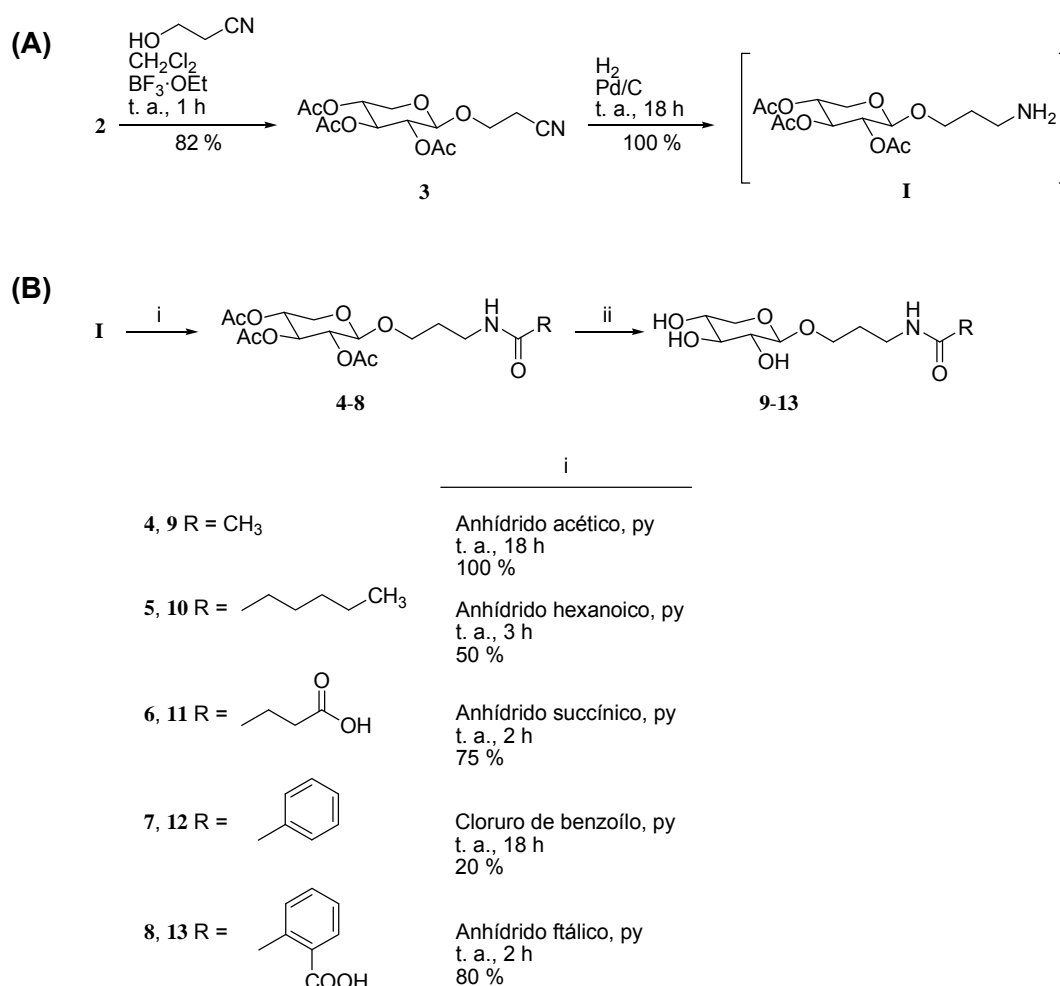


**Figura 35.** (A) Método general para la obtención de 3-amidopropil xilopiranósidos. (B) Comparación entre la estructura de la xilosil-serina (izqda.) con los compuestos sintetizados (dcha.).

la naturaleza del enlace peptídico, según se muestra en la **Figura 35B**.

Este tipo de estructuras permite además diseñar estrategias de síntesis que posibilitan el acceso a un alto número de compuestos estructuralmente relacionados, de tal modo que de los futuros ensayos biológicos pueda obtenerse información sobre la relación estructura-actividad. Además, la síntesis debe tener lugar en un número reducido de etapas, de manera que pueda ser llevada a cabo, de ser necesario, en escala de gramos.

El proceso seguido se muestra en el **Esquema 2**. El 1,2,3,4-tetra-O-acetil  $\beta$ -D-xilopiranosido (**2**) se hizo reaccionar con 3-hidroxi-propionitrilo para obtener 2-cianoetil



**Esquema 2.** Método de síntesis seguido para la obtención de los xilopiranosidos **9-13**. **(A)** Obtención de la amina intermedia **I**. **(B)** Reacción de la amina **I** con diferentes derivados de ácido para la obtención de los xilopiranosidos. (i) Ver la tabla para las condiciones y rendimientos según el grupo R. Puede verse que este es un método eficaz para generar aglicones con el grupo amido y diferentes grupos R. (ii) MeONa/MeOH, t. a., 1 h. Todas con un rendimiento entre 91-98 %.



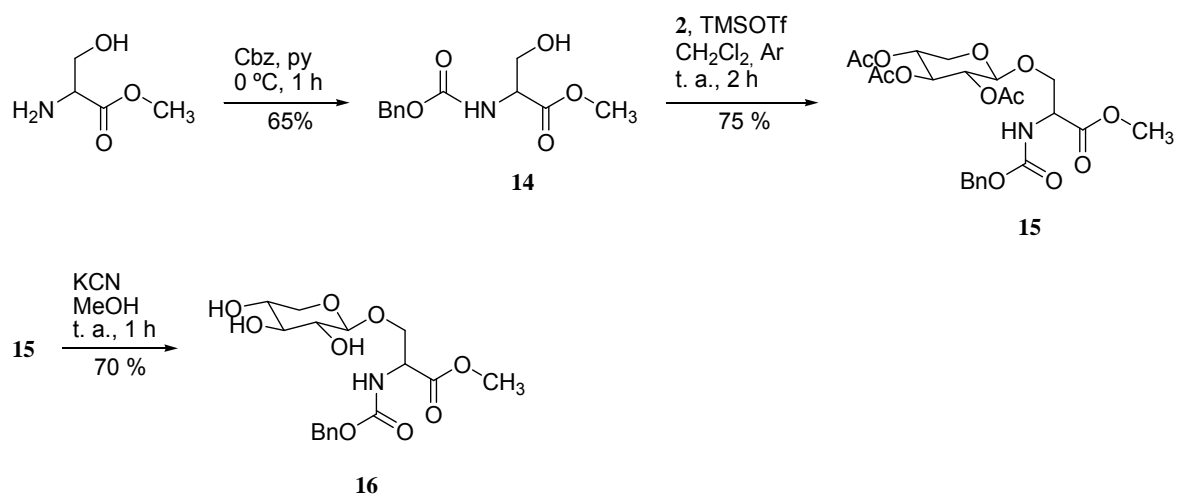
2,3,4-tri-O-acetil  $\beta$ -D-xilopiranosido (**3**) con un 82 % de rendimiento. Mediante la posterior hidrogenación de **3** sobre Pd/C se obtuvo la amina intermedia **I**. Esta se hizo reaccionar *in situ* con diferentes haluros o anhídridos de ácido, obteniéndose así los xilopiranosidos **4-8**, con rendimientos entre el 20 y el 100 %. Estos compuestos se desacetilaron utilizando NaOMe/MeOH, obteniendo así los productos **9-13**.

El producto de partida **2** se obtuvo haciendo reaccionar D-xilosa con acetato sódico en anhídrido acético como disolvente. Tras disolver la mezcla a alta temperatura se procedió a la cristalización de la xilosa peracetilada por enfriamiento, obteniendo el compuesto puro con rendimientos del 50 %. Mediante RMN de protón se comprobó que el producto se encontraba completamente acetilado, detectándose además que el compuesto se mantiene estable con una configuración  $\beta$  en el carbono anomérico.

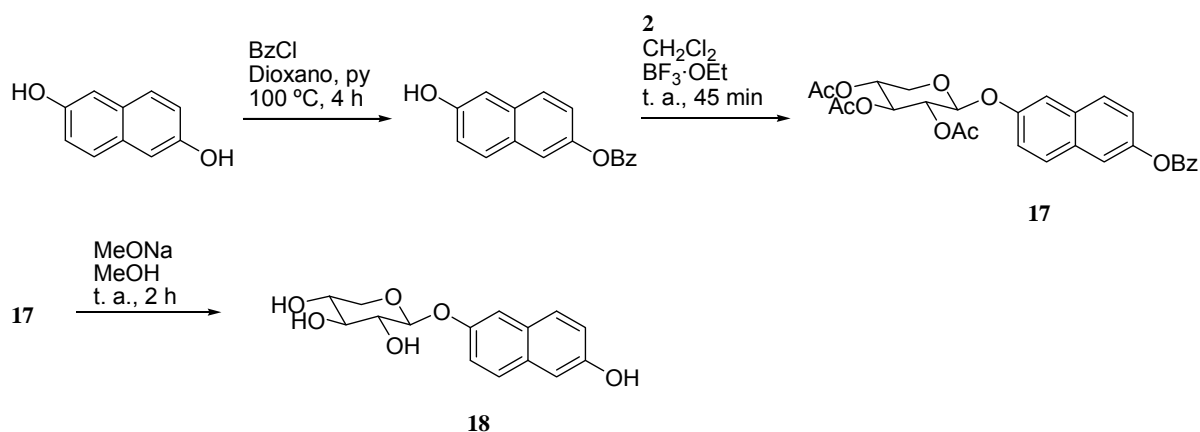
### **Síntesis de xilopiranosil-serina**

Además de sintetizar 3-amidopropil xilopiranosidos se optó por sintetizar un xilopiranosido con aglicón de serina siguiendo el procedimiento descrito por Paulsen y Brenken (1988).

El metil éster de L-serina se hizo reaccionar con cloroformiato de bencilo (Cbz) para obtener una serina protegida (**14**) en el extremo C-t por un éster de metilo y en el extremo N-t con un grupo benciloxicarbonilo. La serina **14** se obtuvo con un rendimiento del 65 %. El compuesto **14** se glicosiló en el grupo hidroxilo libre de la cadena lateral de la serina utilizando 2 eq de xilosa peracetilada (Paulsen y Brenken, 1988). El intermedio acetilado **15** se obtuvo con un rendimiento del 75 %. En un primer intento se desacetiló el compuesto **16** utilizando NaOMe/MeOH, pero se comprobó que se eliminaba el grupo benciloxicarbonilo de la serina. Como nos interesaba mantener este grupo funcional, se realizó una desprotección en condiciones más suaves con KCN (Herzig *et al.*, 1986), obteniéndose el compuesto deseado **16** con un 70 % de rendimiento, un 52 % desde el compuesto de partida (**Esquema 3**).



**Esquema 3.** Secuencia de síntesis utilizada para obtener xilopiranosil- $\beta$ -D-L-serina partiendo de serina-metil éster y 2.



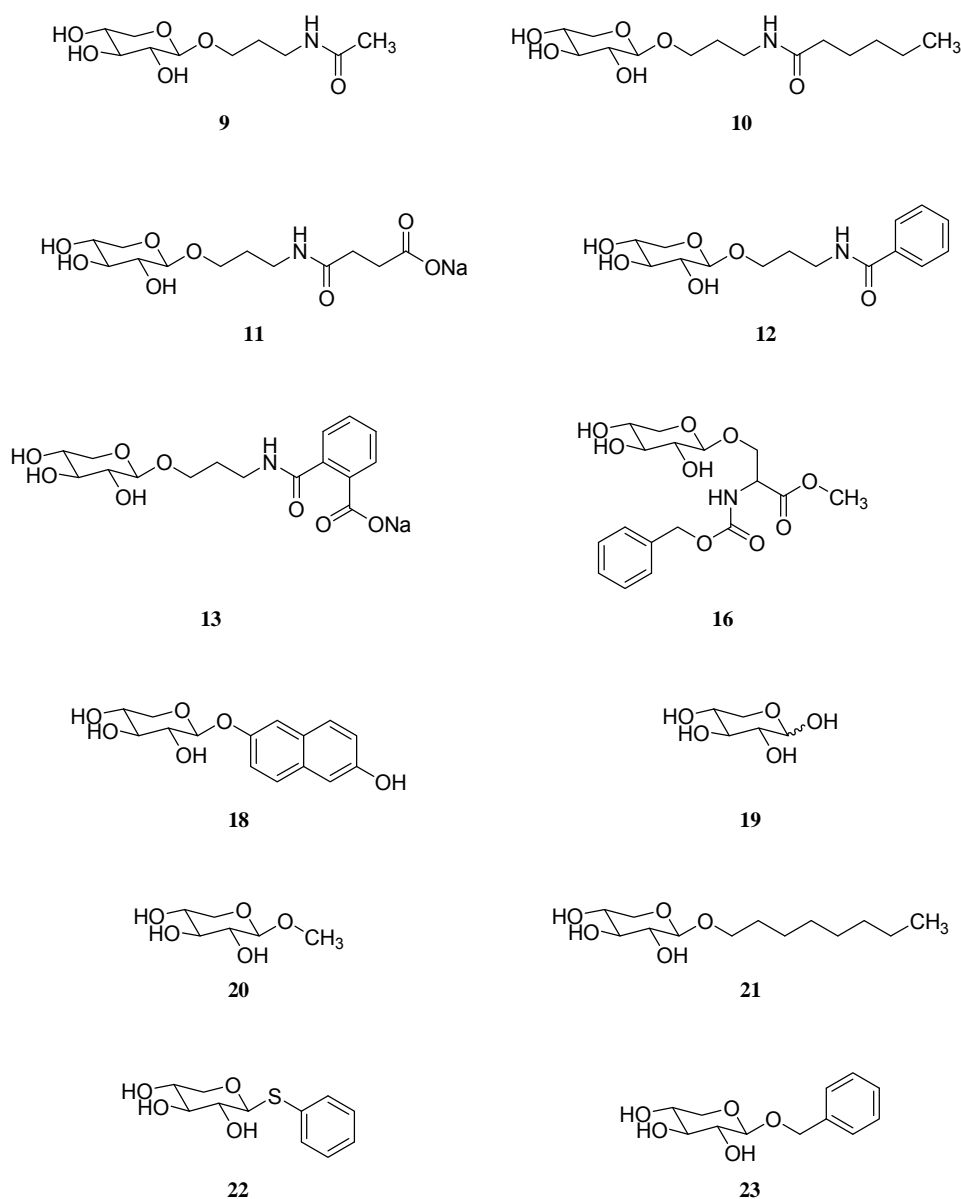
**Esquema 4.** Síntesis del 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido a partir de 2 y 6-benzoiloxi-naftaleno (Mani *et al.*, 2004).

### Síntesis del 2-(6-hidroxinaftil) $\beta$ -D-xilopiranósido (18)

El compuesto 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido (18) se preparó siguiendo el método descrito por Mani *et al.* (2004). En un primer paso se protegió parcialmente el 2,6-dihidroxinaftaleno con cloruro de benzoílo para dar lugar a una mezcla del producto mono- y di-O-benzoilado. Sobre esta mezcla se procedió a la glicosilación del producto mono-O-benzoilado con 1,2,3,4-tetra-O-acetil  $\beta$ -D-xilopiranososa, para obtener el 2-(6-benzoiloxi-naftil) 2,3,4-tri-O-acetil  $\beta$ -D-xilopiranósido (17), que fue desprotegido utilizando NaOMe/MeOH. El producto final 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido (18) se obtuvo con un rendimiento aproximado del 30 % (**Esquema 4**).

## Tercera parte: actividad biológica de los xilopiranósidos como sustratos y aceptores trampa de B4GALT7 y actividad antiproliferante frente a cultivos celulares

Además de los xilopiranósidos sintetizados en la presente memoria se estudiaron otros xilósidos que aparecen en la **Figura 36**. Algunos de ellos son comerciales (**19**, **20**) y otros (21-23) habían sido previamente sintetizados en nuestro grupo de trabajo (López y Fernández-Mayoralas, 1994).



**Figura 36.** Xilopiranósidos utilizados en el presente estudio.

Primero se probó su habilidad para actuar como aceptores en la reacción catalizada por la B4GALT7 recombinante. Para los que dieron un resultado positivo se pasó a medir sus constantes cinéticas.

Además, se comprobó su capacidad para «secuestrar» la actividad de la enzima y actuar como aceptor trampa. Para ello nos valimos de la medida de las IC<sub>50</sub> de todos los xilopiranósidos frente a **1**.

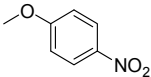
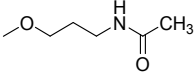
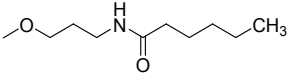
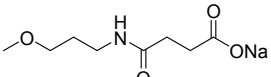
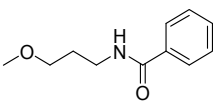
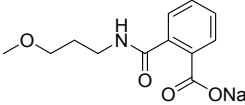
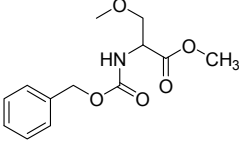
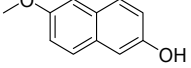
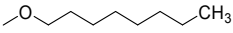
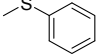
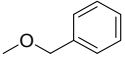
### ***Estudio de xilopiranósidos como aceptores***

Se realizaron reacciones a una concentración inicial de 500  $\mu\text{M}$  para cada uno de los compuestos, con UDP-Gal a concentración saturante (1 mM). Las velocidades de reacción se midieron utilizando el ensayo espectrofotométrico.

Los xilopiranósidos utilizados provenían de disoluciones de *stock* en H<sub>2</sub>O, excepto los xilopiranósidos **16** y **18**, que estaban en una disolución de DMSO-H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v). Estos dos compuestos se compararon frente a la velocidad de reacción de B4GALT7 con **1** como aceptor y DMSO (0,5 %) en el medio de reacción. Además se comprobó el efecto del DMSO en el medio de reacción sobre la actividad B4GALT7. Para ello se realizó un ensayo estándar, con **1** (10 mM) y UDP-Gal (1 mM) como sustratos y añadiendo DMSO (10 %) al medio. Se midió la velocidad de reacción de B4GALT7 en ausencia y presencia de DMSO. Las velocidades relativas resultaron casi idénticas, 100 y 99,4 % respectivamente, indicando que la presencia de un 10 % de DMSO no afecta a la actividad de B4GALT7.

A una concentración de 500  $\mu\text{M}$  los xilopiranósidos mostraron un amplio rango de velocidades relativas (comparadas con la velocidad de **1** a la misma concentración), que se resumen en la **Tabla 15**. Los únicos compuestos que no mostraron actividad detectable frente a B4GALT7 en las condiciones del ensayo fueron D-xilosa (**19**) y metil  $\beta$ -D-xilopiranósido (**20**), lo que contrasta con la literatura, donde se describe que ambos son sustratos de B4GALT7 (Helting y Rodén, 1969; Parsek *et al.*, 2010) y que, además, son capaces de cebar la biosíntesis de GAG artificiales, aunque menos eficientemente que otros xilopiranósidos con aglicones más voluminosos (Levitt y Dorfman, 1973; Schwartz *et al.*, 1974a). El hecho de que no hayamos detectado

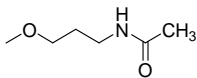
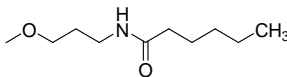
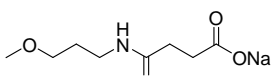
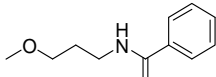
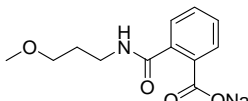
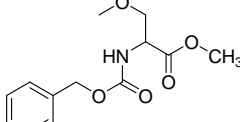
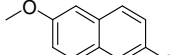
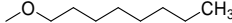

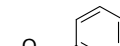
**Tabla 15.** Velocidades de reacción frente a diferentes xilopiranósidos (500  $\mu\text{M}$ )

Entrada	Aglicón <sup>[a]</sup>	$v_{\text{rel}}$ (%)
1		100,0
9		57,5
10		88,8
11		80,3
12		157,2
13		249,6
16 <sup>[b]</sup>		314,1
18 <sup>[b]</sup>		31,9
19	-OH	0
20	-O-CH <sub>3</sub>	0
21		144,0
22		142,4
23		153,0

<sup>[a]</sup> Todos los aglicones están en conformación  $\beta$ , excepto **19**, que presenta una mezcla anomérica  $\alpha$  y  $\beta$ .  
<sup>[b]</sup> Con DMSO (0,5 %) en el medio de reacción.

actividad podría deberse a limitaciones de la metodología utilizada, pero parece claro que el no haber detectado actividad podría deberse a que son los dos únicos compuestos que o no poseen aglicón o este no es lo suficientemente voluminoso como para que la enzima lo reconozca de forma eficiente. Por otra parte, son especialmente reseñables los resultados obtenidos con los compuestos **13** y **16**, ya

**Tabla 16.** Constantes cinéticas obtenidas para los xilopiranosidos

Entrada	Aglicón	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)
9		0,75	41,0	5,4 x 10 <sup>4</sup>	–
10		0,75	64,3	8,6 x 10 <sup>4</sup>	–
11		0,56	47,2	8,5 x 10 <sup>4</sup>	–
12		0,53	78,7	1,5 x 10 <sup>5</sup>	–
13		0,40	106,3	2,6 x 10 <sup>5</sup>	–
16 <sup>[a]</sup>		0,53	152,0	2,9 x 10 <sup>5</sup>	–
18 <sup>[a]</sup>		0,58	30,2	5,2 x 10 <sup>4</sup>	0,38
21		0,37	60,7	1,6 x 10 <sup>5</sup>	–
22		0,75	87,4	1,2 x 10 <sup>5</sup>	–
23		0,29	57,6	2,0 x 10 <sup>5</sup>	–

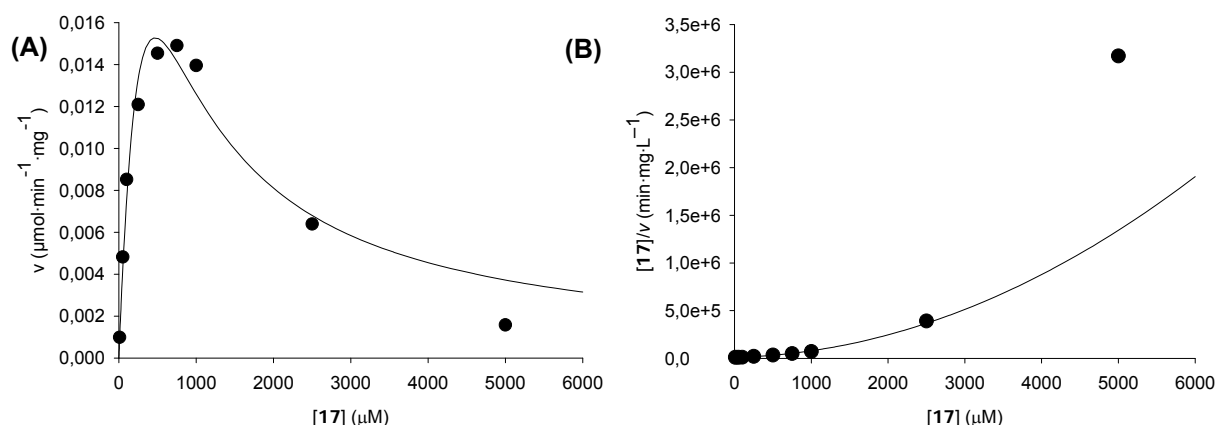
<sup>[a]</sup> Con DMSO (10 %) en el medio de reacción.

que con ellos la velocidad de reacción fue 2,5 y 3 veces superior a la alcanzada con el sustrato de referencia.

## Medida de los parámetros cinéticos

Para los xilopiranosidos que habían mostrado actividad, se pasó a determinar las constantes cinéticas. Los ensayos se realizaron como se describe en «materiales y métodos». Las constantes calculadas se recogen en la **Tabla 16**. Para la práctica totalidad de los compuestos se obtuvieron cinéticas hiperbólicas que se ajustan a un comportamiento de Michaelis-Menten y se describen perfectamente con la **ec. 1**.

El compuesto **18** presentó un comportamiento que se desvía de la cinética hiperbólica michaeliana (**Figura 37**). Al igual que para UDP-Gal, este comportamiento



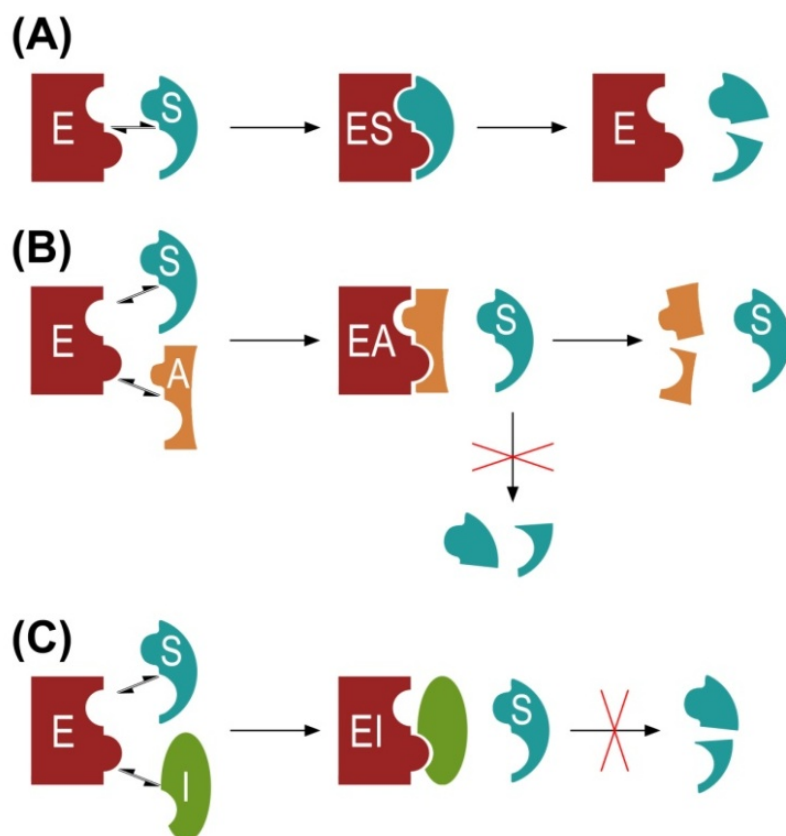
**Figura 37.** Cinéticas de la proteína B4GALT7 respecto al compuesto 18. **(A):** Al igual que con UDP-Gal, la representación de Michaelis-Menten muestra un efecto de inhibición por exceso de sustrato. **(B):** representación de Hanes-Woolf, donde se observa el ajuste parabólico correspondiente a una inhibición por exceso de sustrato.

se puede explicar con el uso de la **ec. 2** que describe la inhibición por exceso de sustrato. Utilizando la **ec. 2** se calculó una  $K_i$  de 0,38 mM.

Los resultados obtenidos se muestran en concordancia con los valores obtenidos para el sustrato de referencia (1). Comparando los valores de los xilopiranósidos 9-11 puede verse como al aumentar la cadena hidrocarbonada aumenta la eficacia catalítica. La introducción de una carga en el compuesto 11 no modifica la eficacia catalítica respecto al compuesto alifático 10. Aunque no se puede encontrar una correlación clara entre la naturaleza de los aglicones y las constantes cinéticas, es de reseñar que los compuestos con mayores eficacias catalíticas son aquellos que poseen grupos aromáticos en el aglicón (13, 16, 23).

### ***Pruebas como aceptores trampa***

Mani *et al.* (1998) describieron que el 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido (18) era un eficaz agente anticancerígeno. Más tarde ligaron esta capacidad antiproliferante con la habilidad del compuesto para interferir en el metabolismo de los HS de las células transformadas (Mani *et al.*, 2004). Es decir, el efecto anticancerígeno dependía de la habilidad de este compuesto para entorpecer el normal funcionamiento de la maquinaria biosintética «secuestrando» las enzimas encargadas de la biosíntesis de PGHS. El compuesto 18 se comporta, por tanto, como un «aceptor trampa» (Okayama *et al.*, 1973) frente a esta enzima.



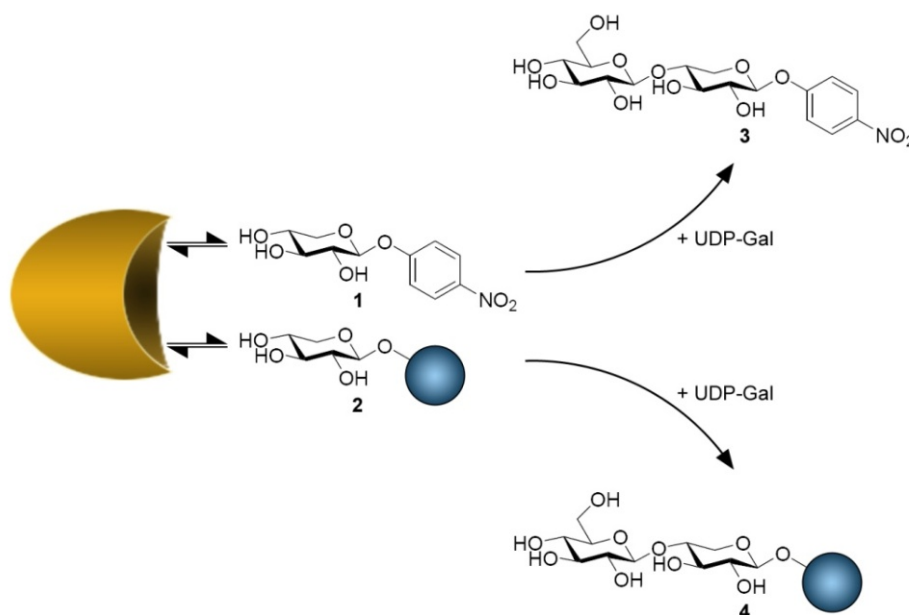
**Figura 38.** (A) La enzima (E) se une a su sustrato natural (S) liberando los productos de reacción. (B) El «aceptor trampa» (A) es capaz de actuar como sustrato compitiendo con S por el sitio activo, pudiendo secuestrar a la enzima para que sintetice un producto «no natural». (C) El proceso se puede comparar con la unión de un inhibidor competitivo (I) al centro activo de una proteína. Si A e I son lo bastante potentes, pueden llegar a impedir que S se una a la enzima.

Si medimos en una reacción la formación de un «producto trampa» frente a un «producto natural», podemos medir la capacidad de los putativos aceptores trampa de afectar al funcionamiento de la proteína frente a un sustrato dado (**Figura 38**).

Por lo tanto, una forma de determinar lo buen o mal sustrato trampa que es un determinado compuesto frente a B4GALT7 sería medir su capacidad de inhibir la actividad de esta enzima con un sustrato de referencia. En nuestro caso el sustrato de referencia fue el *p*-Nph- $\beta$ -D-xyl (1). Se procedió a medir la capacidad de los diferentes xilopiranósidos sintetizados para interferir en la formación del disacárido D-Gal- $\beta$ (1,4)-D-Xyl- $\beta$ (1,O)-*p*-Nph (**Figura 39**).

Para calcular la IC<sub>50</sub> se utilizó el modelo de Hill-Slope, que se ajusta a la siguiente ecuación:





**Figura 39.** El xilopiranosido que funciona como «aceptor trampa» (2) de B4GALT7, es capaz de secuestrar su actividad enzimática de forma que esta enzima sintetizará el disacárido 4 en lugar del 3. Como sustrato de referencia se utilizó el xilopiranosido 1.

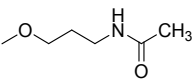
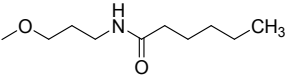
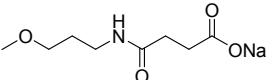
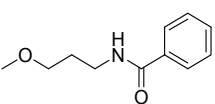
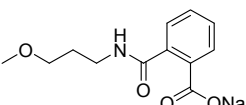
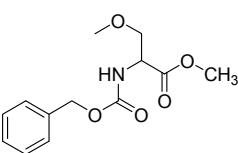
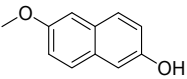
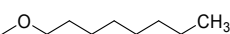

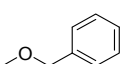
$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^c} \quad [3]$$

donde  $y$  representa la relación entre la velocidad de reacción en presencia de una concentración de sustrato inhibidor  $[I]$  y la velocidad de reacción en ausencia de ese inhibidor,  $\min$  y  $\max$  representan los límites superior (máxima velocidad) e inferior (máxima inhibición), respectivamente, y  $c$  es el coeficiente de Hill.<sup>[19]</sup>

Se realizaron reacciones con concentración saturante de 1 y concentraciones variables de cada uno de los xilopiranosidos estudiados. Todas las reacciones se analizaron en HPLC utilizando una columna Lichrosorb RP18 (C18) y una fase móvil de TFA al 0,1 % en H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN 17:3 (v/v). En esas condiciones, los picos de los xilopiranosidos 18 y 22 solapaban con el pico del disacárido D-Gal-β(1,4)-D-Xyl-β(1,0)-p-Nph. Para estos dos casos se utilizó una columna *mediterranean sea*<sub>18</sub> (C18) con una fase móvil de TFA al 0,1 % en H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN 87:13 (v/v).

<sup>[19]</sup> Cf. Assay Guidance Manual Version 5.0, **2008**, Eli Lilly and Company y NIH Chemical Genomics Center. Disponible en línea en: [http://www.ncgc.nih.gov/guidance/manual\\_toc.html](http://www.ncgc.nih.gov/guidance/manual_toc.html) (último acceso el 16 de agosto de 2010).

**Tabla 17.** Xilopiranósidos como aceptores trampa.  
Medida de las IC<sub>50</sub>.

Entrada	Aglicón <sup>[a]</sup>	IC <sub>50</sub> (mM)	Error (%)
9		3,69	707
10		2,46	452
11		3,96	751
12		1,04	19,9
13		0,61	27,8
16 <sup>[b]</sup>		2,39	165
18 <sup>[b]</sup>		0,30	5,8
19 <sup>[c]</sup>	-OH	>20	n. d.
20 <sup>[c]</sup>	-O-CH <sub>3</sub>	>20	n. d.
21		0,95	9,8
22		0,52	323
23		1,26	52,0

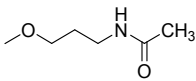
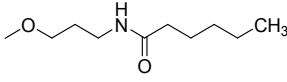
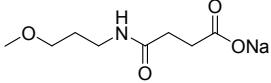
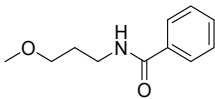
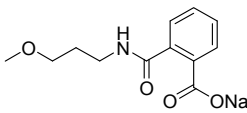
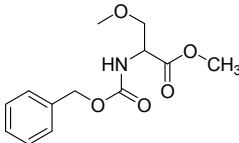
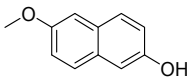
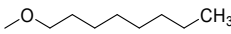

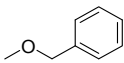
<sup>[a]</sup> Todos los aglicones están en conformación  $\beta$ , excepto **19**, que presenta una mezcla anomérica  $\alpha$  y  $\beta$ .

<sup>[b]</sup> Con DMSO (10 %) en el medio de reacción.

<sup>[c]</sup> Aunque los compuestos no mostraron actividad detectable como sustrato de B4GALT7 se midió su IC<sub>50</sub>.

En la **Tabla 17** se muestran las IC<sub>50</sub> calculadas para los diferentes xilopiranósidos. En general, los datos se ajustaron bien al modelo Hill-Slope, pero en algunos casos (xilopiranósidos **9**, **10**, **11**, **16**, **22** y **23**) el % de error de ajuste superó el 40 %, valor que se considera límite para un ajuste aceptable a la curva. Esto es debido a que la asíndota inferior (*min*) no pudo definirse de manera satisfactoria.

**Tabla 18.** Xilopiranosidos como aceptores trampa. Medida de las  $IC_{50}$ . Los datos se ajustaron al modelo de Hill-Slope (**ec. 3**) y a la **ec. 4**. En negro se encuentran los valores considerados como definitivos.

Entrada	Aglicón <sup>[a]</sup>	Hill-Slope ( <b>ec. 3</b> )		<i>min</i> = 0 ( <b>ec. 4</b> )	
		$IC_{50}$ (mM)	% error	$IC_{50}$ (mM)	% error
9		3,69	707	3,69	28,8
10		2,46	452	2,46	30,2
11		3,96	751	3,96	7,1
12		1,04	19,9	1,3	14,8
13		0,61	27,8	0,61	20,7
16 <sup>[b]</sup>		2,39	165	2,39	26,9
18 <sup>[b]</sup>		0,30	5,8	0,36	51,3
19	-OH	>20	n. d.	>20	n. d.
20	-O-CH <sub>3</sub>	>20	n. d.	>20	n. d.
21		0,95	9,8	1,06	5,43
22		0,52	323	0,52	26,5
23		1,26	52,0	2,62	26,9

<sup>[a]</sup> Todos los aglicones están en conformación  $\beta$ , excepto 19, que presenta una mezcla anómérica  $\alpha$  y  $\beta$ .  
<sup>[b]</sup> Con DMSO (10 %) en el medio de reacción.

Para estos casos se utilizó un modelo alternativo, ajustando la **ec. 3** para que el valor de *min* tienda a cero, con lo que ésta quedaría como:

$$y = \frac{\max}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^c} \quad [4]$$

Si se observa una reducción significativa en el porcentaje del error de ajuste al utilizar la **ec. 4** en vez de la **ec. 3**, podremos concluir que se ajustan mejor a ese modelo que al de Hill-Slope.<sup>[20]</sup> La **Tabla 18** muestra los resultados comparados al utilizar ambos ajustes. Puede observarse una disminución significativa en los porcentajes de error de ajuste en los xilopiranósidos **9, 10, 11, 16, 22 y 23** (bajan hasta valores entre 7 y 30 % dependiendo del compuesto). Además, para el resto de xilopiranósidos los valores de IC<sub>50</sub> se mantienen iguales para el resto de xilopiranósidos, aunque en el caso de **12, 21 y 23** se producen pequeñas variaciones que no parecen significativas.

### **Caracterización de la inhibición de B4GALT7 producida por los «aceptores trampa»: cálculo de la $k_i$ de 2-(6-hidroxinaftil) $\beta$ -D-xilopiranósido frente a *p*-nitrofenil $\beta$ -D-xilopiranósido**

La constante de inhibición aparente,  $k_i$ , del compuesto 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido (**18**) frente a **1** se calculó tal y como aparece reflejado en «materiales y métodos». Los datos de velocidad inicial obtenidos en los diferentes estudios cinéticos de inhibición, fueron tratados con las ecuaciones que describen la inhibición competitiva, acompetitiva y mixta (**ecs. 5, 6 y 7** respectivamente):

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{k_{ic}}\right) + [S]} \quad [5]$$

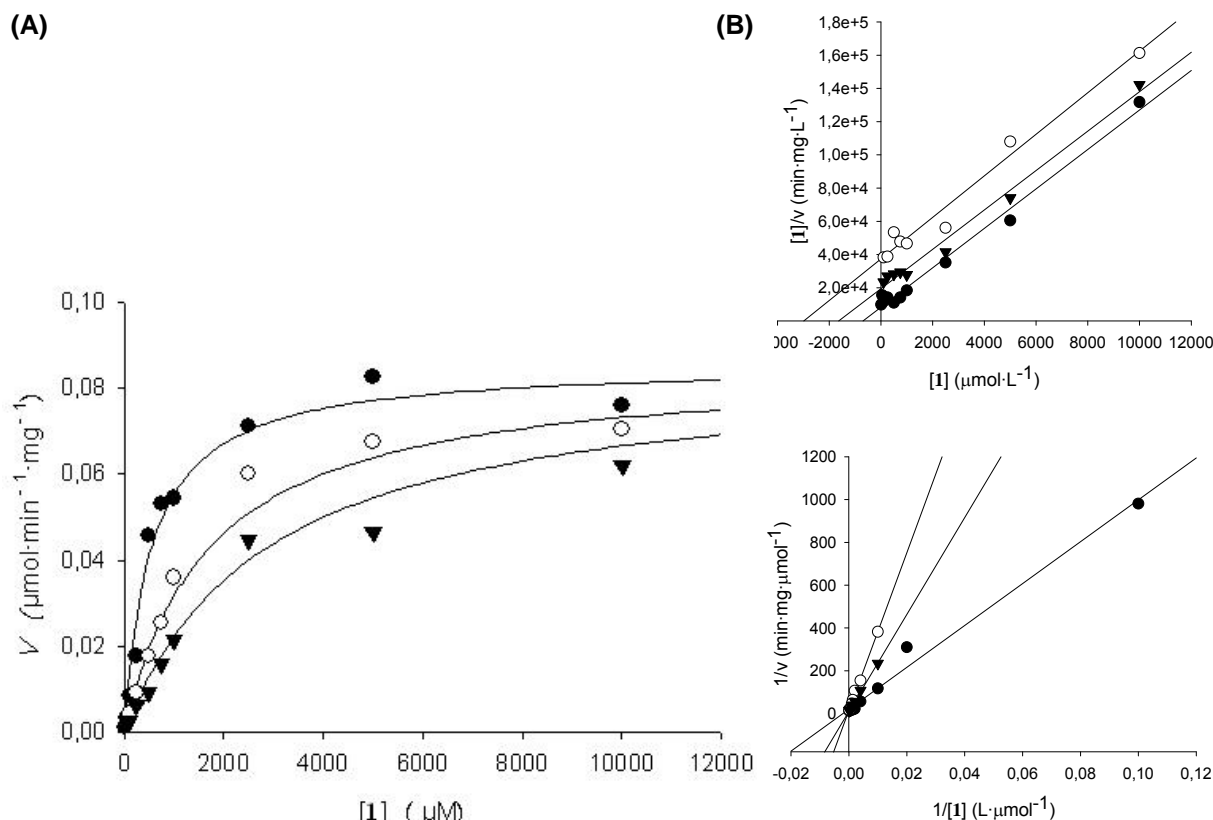
$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{k_{iu}}\right)} \quad [6]$$

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{k_{ic}}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{k_{iu}}\right)} \quad [7]$$

donde  $[I]$  representa la concentración de inhibidor (**18**),  $k_{ic}$  es la constante aparente de inhibición competitiva y  $k_{iu}$  es la constante aparente de inhibición acompetitiva.

Los datos obtenidos se representaron utilizando la aproximación lineal de Hanes-Woolf ( $[1]/V$  vs  $[1]$ ) y Lineweaver-Burk ( $1/V$  vs  $1/[1]$ ). Las representaciones lineales mostraron, respectivamente, un patrón de líneas paralelas con una mayor ordenada

<sup>[20]</sup> Ibid.



**Figura 40.** Representaciones de los datos de actividad de B4GALT7 frente a **1** en presencia de concentraciones crecientes de **18**: 0 (●), 250 (○) y 500  $\mu\text{M}$  (▼). **(A)** Representación de Michaelis-Menten. **(B)** Representación de Hanes-Woolf (arriba) y Lineweaver-Burk (abajo). Las curvas muestran el típico patrón de inhibición competitiva.

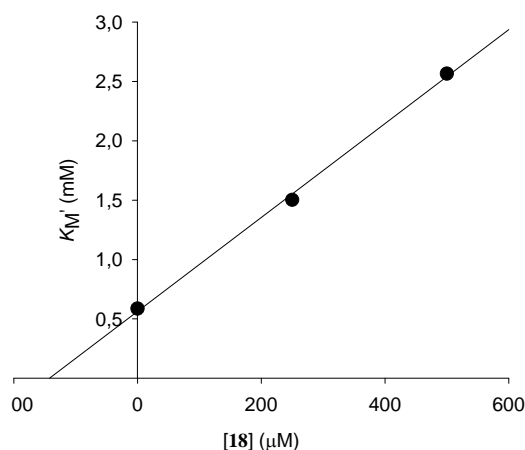
en el origen según aumentaba la concentración de **18** y una serie de rectas que se cortan en el eje de ordenadas con menor pendiente según aumentaba la concentración de **18** (**Figura 40**). Este patrón es el típico de un inhibidor competitivo (Cornish-Bowden, 2004).

Partiendo de la **ec. 5**, puede definirse  $K'_M$  como:

$$K'_M = K_M \left( 1 + \frac{[I]}{k_{ic}} \right) \quad [8]$$

donde  $k_{ic}$  es la constante de inhibición competitiva de **18** e  $[I]$  su concentración, quedando la **ec. 5** como:

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K'_M + [S]} \quad [9]$$



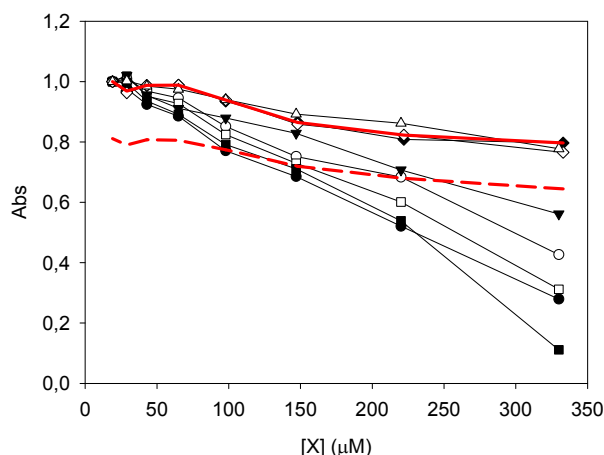
**Figura 41.** Representación de  $K'_M$  frente a la concentración de **18** para obtener la  $k_{ic}$ .

La constante de inhibición aparente para **18** se calculó representando los valores de  $K'_M$  obtenidos frente a la concentración del inhibidor a la cual se realizaron cada uno de los ensayos cinéticos (**Figura 41**). El valor calculado para  $k_{ic}$  fue de 0,14 mM.

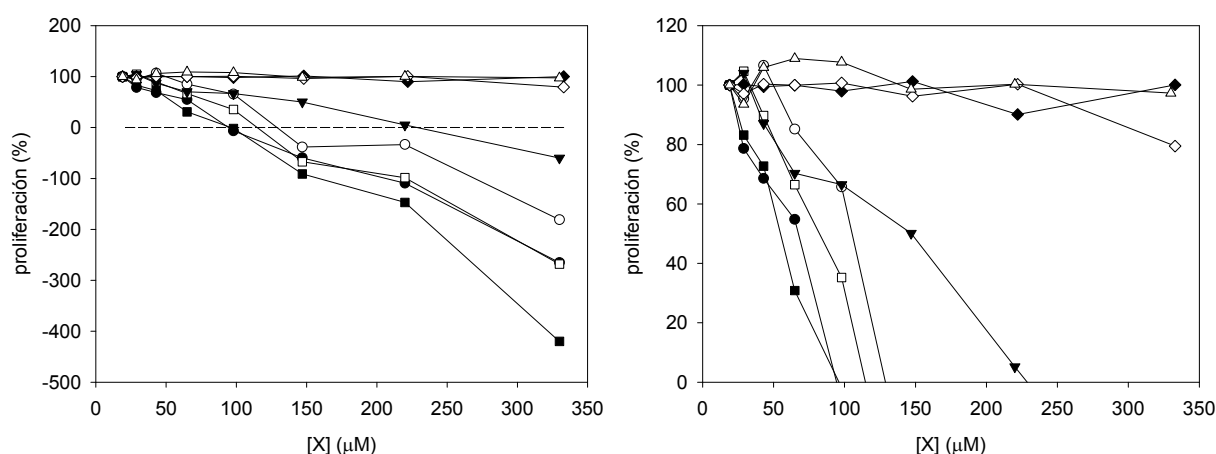
### ***Pruebas como agentes antiproliferantes***

2-(6-Hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido (**18**) es un potente anticancerígeno y es capaz de arrestar el crecimiento en varias líneas tumorales (Mani *et al.*, 1998). Uno de sus objetivos de esta tesis doctoral es comprobar si existe alguna relación entre la eficacia catalítica de B4GALT7 frente a los xilopiranósidos y la capacidad antiproliferante de éstos frente a la línea celular A549 de carcinoma pulmonar. Los xilopiranósidos seleccionados para este estudio fueron **9**, **10**, **16**, **20**, **22**. Esta serie presenta un amplia diferencia estructural en los aglicones además de una alta variabilidad en las IC<sub>50</sub> frente a la enzima (entre 0,52 y 3,69 mM). Además, se incluyó el xilopiranósido **18** como control positivo, ya que su capacidad antiproliferante frente a esta línea celular ha sido ya demostrada (Mani *et al.*, 1998) y los derivados acetilados **15** y metil  $\beta$ -D-2,3,4-tri-O-acetil-xilopiranósido (**24**), ya que está descrito que los glicósidos peracetilados pueden penetrar mejor hacia el interior celular, donde luego son desacetilados por las carboxilesterasas endógenas (Sarkar *et al.*, 1995, 1997, 2000).

Se crecieron células tal y como se describe en los procedimientos experimentales con 25 ng/mL de EGF y concentraciones variables de cada xilopiranósido. Como



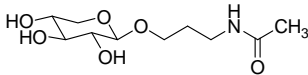
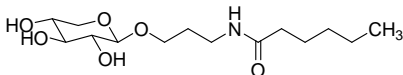
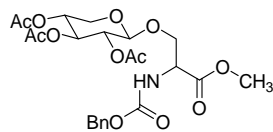
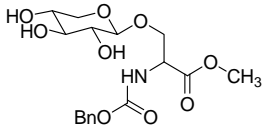
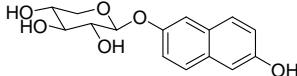
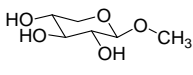
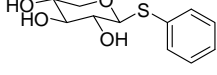
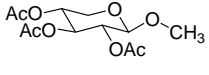
**Figura 42.** Efecto de los xilopiranósidos **9** (●), **10** (○), **16** (□), **18** (▼), **20** (◆) y **22** (△) y de los derivados acetilados **15** (■), y **24** (◇), en el crecimiento de las células A549 en presencia de 25 ng/mL de EGF. C1 (—) es el control positivo de proliferación y C2 (---) el negativo. Los valores por debajo de C2 indican muerte celular por la citotoxicidad del compuesto.



**Figura 43.** Representación del tanto por ciento de proliferación, frente a la concentración de xilopiranósido **9** (●), **10** (○), **15** (■), **16** (□), **18** (▼), **20** (◆), **22** (△) y **24** (◇). Para el cálculo de la  $IC_{50}$  sólo se tuvieron en cuenta los resultados positivos (derecha); por debajo de 0 implica citotoxicidad.

controles se cultivaron células con EGF y sin xilopiranósidos (C1) y en ausencia tanto de EGF como de xilopiranósidos (C2). Como se puede observar en la **Figura 42**, a partir de 100-150  $\mu M$  los compuestos presentan cierta citotoxicidad, manifestada como los valores de absorbancia que se encuentran por debajo de la línea del control C2.

**Tabla 19.** Xilopiranósidos como antiproliferantes: cálculo de las  $IC_{50}$  frente al crecimiento de células en cultivo.

Entrada	Estructura	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
9		68
10		120
15		54
16		88
18		150
20		>330
22		>330
24		>330

Con estos datos se pudo calcular el tanto por ciento de proliferación  $p$  con la **ec. 10**, teniendo en cuenta que, en ausencia de suero, prácticamente no hay proliferación:

$$p = 100 \cdot \left( \frac{A_x - A_{C2}}{A_{C1} - A_{C2}} \right) \quad [10]$$

donde  $A_x$  es la absorbancia (a 570 nm) en presencia del xilopiranósido  $x$ ,  $A_{C1}$  es la absorbancia del control C1 (con EGF) y  $A_{C2}$  es la absorbancia del control C2 (sin EGF). Se representó  $p$  frente a la concentración de cada xilopiranósido (**Figura 43**) para calcular las  $IC_{50}$  de proliferación, que se recogen en la **Tabla 19**.



Como puede verse a tenor de estos resultados, no existe una correlación clara entre las  $IC_{50}$  de los xilopiranósidos frente a B4GALT7 (**Tabla 18**) y sus  $IC_{50}$  de proliferación (**Tabla 19**). Los únicos xilopiranósidos que no mostraron actividad antiproliferante fueron **20**, **22** y **24**. En cuanto a **20** y su derivado peracetilado **24**, la ausencia de antiproliferación podría relacionarse con que sea un mal sustrato de B4GALT7: en nuestras condiciones de reacción y análisis no se ha detectado actividad significativa de la enzima sobre el producto (**Tabla 15**). En cuanto al compuesto **7**, aunque comparativamente presenta la  $IC_{50}$  más baja y una constante catalítica relativamente alta (**Tabla 16** y **Tabla 17**), la falta de actividad antiproliferante coincide con lo observado al utilizar 2-(6-hidroxinaftil) tio- $\beta$ -D-xilopiranósido y otros tio- $\beta$ -D-xilopiranósidos como antiproliferantes: sus  $IC_{50}$  de proliferación son más altas que las de los correspondientes O-glicósidos (Mani *et al.*, 1998, Jacobsson *et al.*, 2007). El resto de los xilopiranósidos testados mostraron  $IC_{50}$  de proliferación menores que el 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranósido (**18**) y se mostraron citotóxicos a altas concentraciones, como indican los resultados negativos de proliferación celular. De todos los compuestos ensayados los xilopiranósidos **9**, **10**, **15** y **16** son los que presentan una actividad antiproliferante prometedora.



## **Capítulo 6: discusión de resultados**



Como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria, se ha descrito que utilizando xilopiranósidos con aglicones hidrófobos, el crecimiento de células tumorales puede ralentizarse (Johnston y Keller, 1979) o inhibirse completamente (Kolset *et al.*, 1990; Mani *et al.*, 1998, 2004). Esta capacidad antiproliferante depende de que los xilopiranósidos ceben la biosíntesis de GAG al actuar como aceptores trampa de B4GALT7. Los GAG generados son degradados por las células y como resultado aparecen fragmentos en el núcleo celular que inducen la apoptosis (Jacobsson *et al.*, 2006).

Debido a esto y a que B4GALT7 es una de las enzimas de velocidad limitante en el proceso biosintético (Robinson y Robinson, 1981; Nakamura *et al.*, 2002; Takemae *et al.*, 2003), sería interesante comprobar si existe alguna relación entre la capacidad antiproliferante de los xilopiranósidos y su capacidad como aceptores y/o aceptores trampa de la enzima.

### ***Desarrollo del sistema de expresión***

Los estudios de una proteína deben hacerse con fracciones puras y homogéneas de los preparados enzimáticos. Para estudiar el efecto de los xilopiranósidos en

B4GALT7 era necesario, por tanto, desarrollar un sistema de expresión que permitiese la obtención de la enzima en cantidades necesarias para los ensayos y con alta pureza. La proteína B4GALT7 ha sido clonada por otros grupos de investigación utilizando aproximaciones diferentes a las utilizadas en esta memoria. Almeida *et al.* (1999) obtuvieron una forma truncada de la proteína clonándola en células de insecto pero el proceso de purificación rindió preparados semi puros. Por otro lado, Okajima *et al.* (1999b) clonaron la enzima fusionada a la proteína A y la obtuvieron en células de ratón. Otros intentos de sobreexpresión y purificación fueron realizados expresando B4GALT7 como una proteína de membrana en levaduras, pero era imposible cuantificar la cantidad de proteína utilizada en cada ensayo (Gulberti *et al.*, 2005). Con vistas de (a) simplificar el sistema de expresión-purificación y (b) obtener una proteína con un mayor grado de pureza y lo más cercana posible de la forma original, diseñamos un sistema basado en la sobreexpresión en *Escherichia coli* y en la purificación en un paso por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC). Esta metodología de expresión heteróloga la hemos utilizado en nuestro laboratorio en anteriores ocasiones con resultados satisfactorios (Bastida *et al.*, 2003; Sánchez-Moreno *et al.*, 2004; Latorre, 2008).

Las principales desventajas de trabajar con *E. coli* como sistema de expresión heteróloga son la formación de cuerpos de inclusión, la ausencia de modificaciones postraduccionales (incluyendo glicosilación y formación de puentes de sulfuro) y la presencia de codones no habituales en la secuencia a expresar (Sørensen y Mortensen, 2005; Peti y Page, 2007; Yin *et al.*, 2007). No obstante, desde la expresión de la somatostatina bovina en *E. coli* (Itakura *et al.*, 1977), el número de proteínas de mamíferos clonadas y expresadas en este microorganismo no ha dejado de crecer, siendo el sistema hospedador más utilizado en biotecnología (Yin *et al.*, 2007).

La prevención de los cuerpos de inclusión puede hacerse utilizando diferentes estrategias, entre las más usadas se encuentra el uso de colas (*tags*) fusionadas a la proteína de interés. Además de facilitar plegamiento e incrementar la solubilidad, el uso de estas colas supone mejoras en el rendimiento de purificación y la prevención de la proteólisis (Arnau *et al.*, 2006). Con motivo de aumentar la solubilidad y facilitar el proceso de purificación, la enzima B4GALT7 se obtuvo eliminando el fragmento transmembranal (aumentando así la hidrofilia) y fusionando la proteína a una cola de

histidinas. Se sabe que las colas pueden afectar al plegamiento de la proteína resultando en la alteración de la actividad enzimática (Arnau *et al.*, 2006). En lo relativo a las colas de histidina, se ha descrito que pueden afectar a la estabilidad térmica de las proteínas fusionadas, pero en general las proteínas mantienen los valores de eficacia catalítica (Latorre, 2008), por lo que son aptas para ser utilizadas en estudios enzimáticos.

Las glicosilaciones que se dan en las proteínas son claves para diferentes aspectos, desde hacer que la proteína sea más soluble, hasta facilitar el plegamiento correcto o estar implicadas en la actividad funcional (Dwek, 1996). En la familia de B4GALT, todas las isoenzimas tienen sitios de *N*-glicosilación en el C-t, y B4GALT2-6, además, en el N-t (Amado *et al.*, 1999), algunos de los cuales parecen encontrarse glicosilados (Nomura *et al.*, 1998). Estos sitios están conservados en la familia excepto en el caso de B4GALT7. Utilizando el programa NetNGlyc 1.0<sup>[21]</sup> se encontró una secuencia consenso de *N*-glicosilación: Asn<sup>127</sup>-Ser<sup>128</sup>-Thr<sup>129</sup> y con el programa YingOYang 1.2 (Gupta y Brunak, 2002)<sup>[22]</sup> se encontraron dos posibles sitios de *O*-glicosilación en los residuos Ser<sup>42</sup> y Thr<sup>298</sup> (**Figura 44**). No obstante, parece que la proteína obtenida en células de ratón no se encuentra glicosilada (Okajima *et al.*, 1999b), por lo que este aspecto no debería presentar un problema al utilizar *E. coli* como hospedador.

La construcción de B4GALT7 fusionada a una cola de histidinas (ht-B4GALT7) se expresó en la cepa BL21 (DE3), evitando así problemas de proteólisis endógena (Peti y Page, 2007), y se purificó en un único paso mediante IMAC en resinas de agarosa-IDA-Ni<sup>2+</sup>, obteniendo fracciones muy puras (>98%) con una cantidad de proteína de 5 mg por litro de cultivo. La identidad de la proteína se confirmó positivamente mediante MALDI-TOFF y la caracterización cinética, dependiente de Mn<sup>2+</sup>, arrojó resultados que concuerdan con lo publicado en la literatura: especificidad de sustrato restringida por residuos de xilosa como aceptores y UDP-Gal como donador, obteniéndose valores de  $K_M$  en el mismo orden que los que se han publicado hasta la fecha (Helting y Rodén, 1969; Schwartz y Rodén, 1975; Daligault *et al.*, 2009; Pasek *et al.*, 2010). El pH óptimo (5,0) es coherente con la localización de la proteína en el aparato de Golgi (Suguraman y Silbert, 1991; Vadaie *et al.*, 2002).

<sup>[21]</sup> Disponible en el acceso en línea <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

<sup>[22]</sup> Disponible en el acceso en línea <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>

ATG	GGC	AGC	AGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	CCG	CGC	GGC	AGC	CAT
M	G	S	S	H	H	H	H	H	H	S	S	G	L	V	P	R	G	S	H
ATG	GCT	AGG	CTC	AGC	TGC	TCT	GGG	GAC	GTG	GCC	CGG	GCA	GTC	AGG	GGA	CAA	GGG	CAG	GAG
M	A	R	L	S	C	S	G	D	V	A	R	A	V	R	G	Q	G	Q	E
ACC	TCG	GGC	CCT	CCC	CGC	GCC	TGC	CCC	CCA	GAG	CCG	CCC	CCT	GAG	CAC	TGG	GAA	GAA	GAC
T	S	G	P	P	R	A	C	P	P	E	P	P	P	E	H	W	E	E	D
GCA	TCC	TGG	GGC	CCC	CAC	CGC	CTG	GCA	GTG	CTG	GTG	CCC	TTC	CGC	GAA	CGC	TTC	GAG	GAG
A	S	W	G	P	H	R	L	A	V	L	V	P	F	R	E	R	F	E	E
CTC	CTG	GTC	TTC	GTG	CCC	CAC	ATG	CGC	CGC	R	F	L	S	AGG	AAG	AAG	ATC	CGG	CAC
L	L	V	F	V	P	H	M	R	R	F	L	S	S	R	K	K	I	R	H
ATC	TAC	GTG	CTC	AAC	CAG	GTG	GAC	CAC	TTC	AGG	TTC	AAC	CGG	GCA	GCG	CTC	ATC	AAC	GTG
I	Y	V	L	N	Q	V	D	H	F	R	F	N	R	A	A	L	I	N	V
GGC	TTC	CTG	GAG	AGC	AGC	AAC	AGC	ACG	GAC	TAC	ATT	GCC	ATG	CAC	GAC	GTT	GAC	CTG	CTC
G	F	L	E	S	S	N	S	T	D	Y	I	A	M	H	D	V	D	L	L
CCT	CTC	AAC	GAG	GAG	CTG	GAC	TAT	GGC	TTT	CCT	GAG	GCT	GGG	CCC	TTC	CAC	GTG	GCC	TCC
P	L	N	E	E	L	D	Y	G	F	P	E	A	G	P	F	H	V	A	S
CCG	GAG	CTC	CAC	CCT	CTC	TAC	CAC	TAC	AAG	ACC	TAT	GTC	GGC	GGC	ATC	CTG	CTG	CTC	TCC
P	E	L	H	P	L	Y	H	Y	K	T	Y	V	G	G	I	L	L	L	S
AAG	CAG	CAC	TAC	CGG	CTG	TGC	AAT	GGG	ATG	TCC	AAC	CGC	TTC	TGG	GGC	TGG	GGC	CGC	GAG
K	Q	H	Y	R	L	C	N	G	M	S	N	R	F	W	G	W	G	R	E
GAC	GAC	GAG	TTC	TAC	CGG	CGC	ATT	AAG	GGA	GCT	GGG	CTC	CAG	CTT	TTC	CGC	CCC	TGC	GGA
D	D	E	F	Y	R	R	I	K	G	A	G	L	Q	L	F	R	P	S	G
ATC	ACA	ACT	GGG	TAC	AAG	ACA	TTT	CGC	CAC	CTG	CAT	GAC	CCA	GCC	TGG	CGG	AAG	AGG	GAC
I	T	T	G	Y	.K.	T	F	R	H	L	H	D	P	A	W	R	K	R	D
CAG	AAG	CGC	ATC	GCA	GCT	CAA	AAA	CAG	GAG	CAG	TTC	AAG	GTG	GAC	AGG	GAG	GGA	GGC	CTG
Q	K	R	I	A	A	Q	K	Q	E	Q	F	K	V	D	R	E	G	G	L
AAC	ACT	GTG	AAG	TAC	CAT	GTG	GCT	TCC	CGC	ACT	GCC	CTG	TCT	GTG	GGC	GGG	GCC	CCC	TGC
N	T	V	K	Y	H	V	A	S	R	T	A	L	S	V	G	G	A	P	C
ACT	GTC	CTC	AAC	ATC	ATG	TTG	GAC	TGT	GAC	AAG	ACC	GCC	ACA	CCC	TGG	TGC	ACA	TTC	AGC
T	V	L	N	I	M	L	D	C	D	K	T	A	T	P	W	C	T	F	S

TGA  
/s/

**Figura 44.** Secuencia del gen y de la proteína quimérica ht-B4GALT7. El dominio correspondiente a la cola de histidinas aparece en amarillo. Sombreados en gris se muestran los codones no habituales. Los sitios teóricos de glicosilación aparecen en color negro (/s/: codón de terminación).

Por tanto, como se demuestra en esta memoria, es posible expresar en *E. coli* el dominio soluble de la B4GALT7 humana fusionado a una cola de histidinas. De hecho, durante la escritura de esta memoria han aparecido varios trabajos en los que se obtuvo al enzima utilizando una aproximación similar a la nuestra (Daligault *et al.*, 2009; Pasek *et al.*, 2010; Talhaoui *et al.*, 2010). En estos trabajos se utilizó *E. coli* como sistema de expresión y la proteína se obtuvo como una forma soluble eliminando el fragmento transmembranal y fusionándola a una proteína, la proteína de unión a maltosa (MBP), la galectina 1 (gal-1) y la glutatión sulfotransferasa (GST), lo que permitió su posterior purificación mediante columnas de afinidad. En estos sistemas, los rendimientos fueron de 23 mg/l de cultivo en el caso de la unión a la



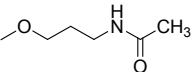
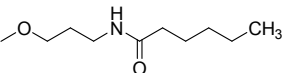
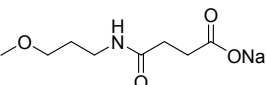
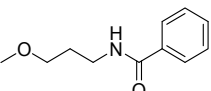
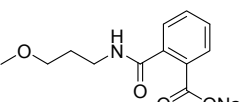
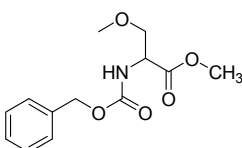
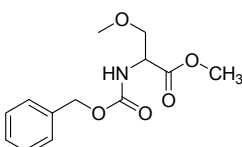
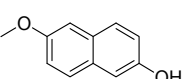
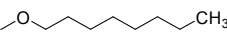

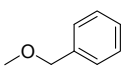
MBP (Daligault *et al.*, 2009), 15 mg/l de cultivo en el caso de la unión a la gal-1 (Pasek *et al.*, 2010) y 2,5 mg mg/l de cultivo en el caso de la unión a la GST (Talhaoui *et al.*, 2010). Estos valores son similares al obtenido en nuestro laboratorio teniendo en cuenta que B4GALT7 se encuentra unida a proteínas de mayor tamaño que la cola de His. Atendiendo a los rendimientos se puede afirmar que los sistemas son relativamente eficientes, aunque son modestos comparados con la obtención de la fosfatasa alcalina (5,4 g/L de cultivo) o el factor de crecimiento de la insulina (8,5 g/L de cultivo), que son de los más eficientes conocidos en el campo de la expresión heteróloga (Yin *et al.*, 2007). Esta diferencia podría deberse, entre otros factores, a la presencia de codones no habituales en la secuencia de B4GALT7 humana. La presencia de estos codones suele traducirse en una pobre expresión en *E. coli* (Sørensen y Mortensen, 2005; Yin *et al.*, 2007), que se acentúa más en el caso de abundancia de AAG y AGG y si éstos aparecen agrupados en *clusters* de más de tres (Sørensen y Mortensen, 2005). En el caso de B4GALT7 existen un total de 36 codones inusuales (de los cuales 6 son de AGG y 11 de AAG, **Figura 44**), aunque se encuentran espaciados, excepto los codones 94-96 (AGG-AAG-AAG) y 237-239 (CGG-AAG-AGG).

### ***Xilopiranósidos como sustratos, aceptores trampa y antiproliferantes***

Una vez optimizado el sistema de expresión y de actividad enzimática *in vitro*, pasamos a estudiar la relación entre la actividad de los xilopiranósidos como sustratos de la enzima y como antiproliferantes.

Existe una fuerte relación entre la actividad antiproliferante de los xilopiranósidos y su capacidad de interferir en la ruta de biosíntesis de los GAG. Así, se ha descrito que los xilopiranósidos capaces de bloquear totalmente la biosíntesis de PG endógenos son los que muestran mayor actividad antiproliferante como en el caso del hexil xilopiranósido. Por el contrario, el C-etil xilopiranósido, que no bloquea la biosíntesis de PG endógenos, no muestra actividad antiproliferante (Kolset *et al.*, 1990). Los xilopiranósidos con actividad antiproliferante pueden, incluso, interrumpir el crecimiento *in ovo* de embriones de pollo, dándose el caso de que los xilopiranósidos

**Tabla 20.** Relación de resultados para los xilopiranósidos frente a B4GALT7 y cultivos celulares. Se muestran las constantes cinéticas ( $K_M$  y  $k_{cat}$ ) y las  $IC_{50}$  *in vitro* frente a B4GALT7 e *in vitro* frente al crecimiento celular de la línea A549.

Entrada <sup>[a]</sup>	Aglicón <sup>[b]</sup>	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$IC_{50}$ (mM) vs B4GALT7	$IC_{50}$ (μM) vs A549
9		0,75	41,0	3,69	68
10		0,75	64,3	2,46	120
11		0,56	47,2	3,96	n. d.
12		0,53	78,7	1,04	n. d.
13		0,40	106,3	0,61	n. d.
15		n. d.	n. d.	n. d.	54
16 <sup>[c]</sup>		0,53	152,0	2,39	88
18 <sup>[c]</sup>		0,58	30,2	0,30	150
19	-OH	n. d.	n. d.	>20	n. d.
20	-O-CH <sub>3</sub>	n. d.	n. d.	>20	>330
21		0,37	60,7	0,95	n. d.
22		0,75	87,4	0,52	>330
23		0,29	57,6	2,62	n. d.
24	-O-CH <sub>3</sub>	n. d.	n. d.	n. d.	>330

<sup>[a]</sup> Todos los compuestos se probaron como xilopiranósidos desacetilados, excepto los compuestos 15 y 24, cuya xilosa se encontraba peracetilada.

<sup>[b]</sup> Todos los aglicones están en conformación  $\beta$ , excepto 19, que presenta una mezcla anomérica  $\alpha$  y  $\beta$ .

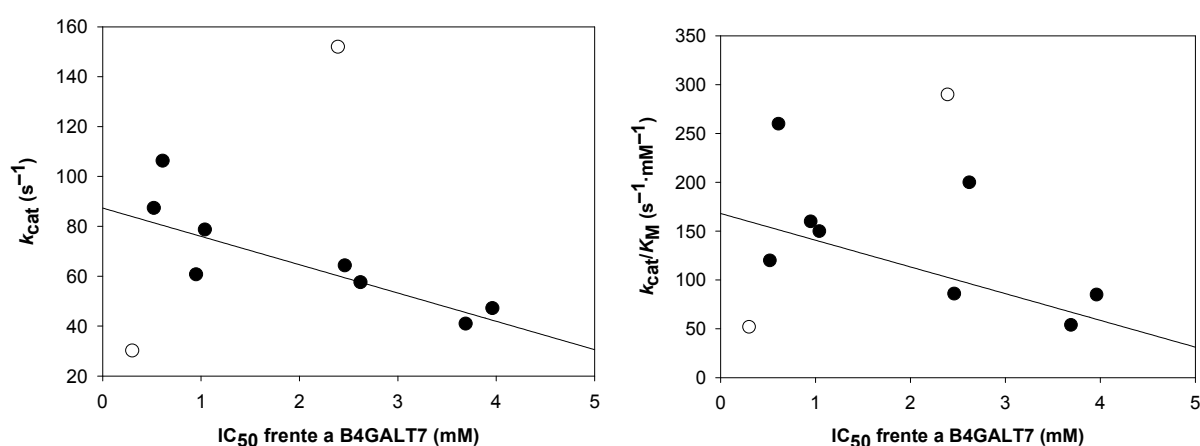
<sup>[c]</sup> Con DMSO (10 %) en el medio de reacción.

que mostraron mejores actividad *in vitro* fueron los más eficaces *in ovo* (Sobue *et al.*, 1987).

La capacidad de los xilopiranósidos de iniciar la síntesis de GAG artificiales, inhibiendo por tanto la biosíntesis de PG naturales, debe depender de la capacidad de los xilopiranósidos de secuestrar la actividad de la enzima B4GALT7. Teniendo esto en cuenta, nos propusimos estudiar si existía una relación entre el comportamiento de los xilopiranósidos como aceptores de B4GALT7 y su capacidad antiproliferante.

Los xilopiranósidos se han probado como sustratos *in vitro* de B4GALT7 a la vez que se ha medido la capacidad para desplazar a un sustrato modelo (**1**) del centro activo. Se han medido las constantes cinéticas de los sustratos en solitario ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ) y la  $IC_{50}$  frente a **1** (el resumen de los datos puede verse en la **Tabla 20**). El tipo de competición entre **1** y los xilopiranósidos se comprobó utilizando el compuesto **18**, obteniendo una gráfica de inhibición competitiva (**Figura 37**), que se corresponde con lo publicado previamente (Robinson y Robinson, 1981).

La capacidad de un determinado sustrato para actuar como un aceptor trampa *in vitro* ( $IC_{50}$ ), guarda cierta relación con la velocidad de transformación ( $k_{cat}$ ) y la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de la enzima B4GALT7. Para ambos parámetros se observa que a mayores valores la  $IC_{50}$  disminuye (**Figura 45**). Un caso especial es el del compuesto **18**, que con menores  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_M$  presenta una  $IC_{50}$  excepcionalmente baja, debido probablemente al efecto adicional de inhibición por exceso de sustrato que presenta frente a B4GALT7 (**Figura 37A**). Aunque para la xilosa y el metil xilopiranósido no se



**Figura 45.** Relación entre  $k_{cat}$  (dcha.) y  $k_{cat}/K_M$  (izqda.) de los xilopiranósidos frente a B4GALT7 y su  $IC_{50}$  frente a **1**.

detectó actividad frente a la enzima, las altas  $IC_{50}$  detectadas indicarían que estos dos compuestos son, efectivamente, sustratos de B4GALT7, como aparece recogido en la bibliografía (Helting y Rodén, 1969; Pasek *et al.*, 2010), pero que no eran detectables como tal bajo nuestras condiciones experimentales.

En cuanto a la actividad antiproliferante de los xilopiranósidos (determinadas con las  $IC_{50}$  frente al crecimiento de células A549) no parece existir ninguna relación entre éstas y sus actividades frente a B4GALT7 ( $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_M$ ). De nuevo, el metil xilopiranósido (**20**) y su derivado peracetilado (**24**) no mostraron ninguna actividad antiproliferante, lo que podría estar relacionado con el hecho de que son malos sustratos de B4GALT7. Por otro lado, el bencil tio- $\beta$ -D-xilopiranósido (**7**) mostró una alta  $IC_{50}$  en cultivos celulares cuando es uno de los mejores sustratos de B4GALT7, con una de las  $IC_{50}$  frente a **1** más bajas y una eficacia catalítica relativamente alta.

En este caso, existen otra serie de factores que han de tenerse en cuenta a la hora de evaluar las actividades antiproliferantes de los xilopiranósidos. Uno de ellos es la capacidad de la célula para internalizar el compuesto mediante un mecanismo de difusión pasiva (Sarkar *et al.*, 1995). En este sentido es muy sintomático el que el compuesto acetilado **15** presente una  $IC_{50}$  frente a la línea celular A549 de 54  $\mu$ M frente al 88  $\mu$ M del compuesto sin acetilar (**16**). Los peracetatos son compuestos más hidrófobos y atraviesan mejor las membranas celulares, por lo que son internalizados más fácilmente (Sarkar *et al.*, 1995, 2000). El compuesto biológicamente activo en el caso de **15** y **16** es el mismo, ya en el interior celular los peracetatos son desacetilados por lipasas endógenas (Sarkar *et al.*, 2000), por tanto, sus diferencias en  $IC_{50}$  pueden explicarse por la mejor internalización en la célula de **15**.

Además, la biosíntesis de PG es un proceso muy complejo y que implica la interacción de un conjunto de enzimas en un entramado macromolecular denominado gagosoma (Ledin *et al.*, 2006; Izumikawa *et al.*, 2008; Presto *et al.*, 2008). En muchos casos, las enzimas biosintéticas modifican su actividad de forma drástica al interaccionar con otras proteínas de la ruta, como es el caso de las HS-POL (Kim *et al.*, 2003) o las ChSy (Izumikawa *et al.*, 2007). En el caso de las enzimas que forman el tetrasacárido conector, se han descrito interacciones entre GalT-I, GalT-II y XT (habiéndose propuesto que forman, como en el caso del gagosoma, un complejo multienzimático), a la vez que una variación drástica en el entorno lipídico del C-t de GalT-I afecta a su estabilidad y actividad enzimática (Schwartz *et al.*, 1974b; Quentin

*et al.*, 1990). Por ejemplo, en pacientes con el síndrome de Ehlers-Danlos se ha observado que, aunque GalT-II es una enzima perfectamente funcional, se observa cierta deficiencia en su acción, debido probablemente a una mala interacción con la forma mutante de GalT-I (Quentin *et al.*, 1990). De esta forma, podría ser que las actividades *in vitro/in vivo* se viesan alteradas una respecto de otra en el contexto de un complejo multienzimático de membrana (Schwartz, 1976; Robinson y Robinson, 1981; Quentin *et al.*, 1990).

Una explicación alternativa a la falta de relación entre actividad como sustrato/aceptor trampa/antiproliferante es que fuese otra galactosiltransferasa distinta de B4GALT7 la que actuase sobre los xilopiranosidos. A este respecto, existe la hipótesis de que puedan existir otras GalT encargadas de la galactosilación de la xilosa o que la galactosilación de xilopiranosidos y proteínas núcleo siguen rutas distintas que convergen en la glucuronosilación del tetrasacárido conector (Moses *et al.*, 1997a, 1997b, 1999).

Aunque no puede descartarse que la galactosilación de los xilopiranosidos y las proteínas núcleo se den en sitios distintos, la existencia de otras enzimas, aún no descubiertas, que galactosilen la xilosa es bastante improbable con los datos de los se cuenta hoy en día. Aunque la enzima B4GALT1 (lactosa sintasa) puede actuar, aun de forma bastante ineficaz, sobre residuos de xilosa y xilopiranosidos (Berliner *et al.*, 1984), los estudios *in vitro* con células deficientes en B4GALT7 y de actividad B4GALT7 con enzimas aislados de dichas líneas celulares no respaldan la existencia de otras glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de GAG (Quentin *et al.*, 1990). Además, la especificidad de sustrato obtenida para B4GALT7 se corresponde con la especificidad de la enzima encargada de actuar sobre los xilopiranosidos (Lugenwa *et al.*, 1996). Por ejemplo, B4GALT7 no puede actuar sobre Glc o Gal, debido a que la existencia del grupo  $-\text{CH}_2\text{OH}$  en C-5 y de un grupo axial en C-4 impiden que la enzima reconozca al sustrato. De la misma forma, los análogos de xilosa con grupos voluminosos en C-5 o los epímeros en C-4 son incapaces de iniciar la biosíntesis de GAG.

Además, el descifrado del genoma humano no sugiere la existencia de genes adicionales que puedan pertenecer a la familia de la B4GALT (Amado *et al.*, 1999; Hennet, 2002; Talhaouie *et al.*, 2010). De hecho, las nuevas B4GALT que se han postulado a lo largo de estos años han resultado ser miembros ya conocidos de la

familia. Por ejemplo al identificar la actividad frente a GlcNAc-6S, inicialmente se descartó que fuese ninguna de las B4GALT conocidas (Seko *et al.*, 1998), y más tarde se vio que era en realidad específica de B4GALT4 (Seko *et al.*, 2003). En el caso de la  $\beta$ GlcNAcT se pensó que podría tener un homólogo humano no descubierto (Van den Nieuwenhof *et al.*, 1999), hoy se sabe que es B4GALT2 (Hennet, 2002). Es difícil, por tanto, que exista una enzima con la misma especificidad de sustrato que B4GALT7 y que no se haya detectado.

## **Conclusiones**





1. Se ha desarrollado un sistema sencillo para la sobreexpresión heteróloga y purificación de la enzima humana B4GALT7 utilizando *E. coli* como organismo hospedador. La enzima recombinante se ha obtenido como una versión truncada en la que se ha eliminado el dominio transmembranal y el extremo N-t y fusionada a una cola de polihistidinas que ha permitido un método sencillo de purificación. La proteína se ha obtenido purificada a homogeneidad, con purezas siempre superiores al 98 %.
2. La enzima recombinante se ha identificado correctamente como B4GALT7 mediante huella peptídica. Se ha comprobado que la actividad enzimática que posee la proteína es correspondiente a una UPP-galactosa: *O*- $\beta$ -D-xilopiranosil 4- $\beta$ -D-galactosiltransferasa, y los parámetros cinéticos obtenidos han sido:  $K_M$  aparente de 0,59 mM y  $k_{cat}$  de 49,78 s<sup>-1</sup> para el sustrato aceptor (*p*-Nph- $\beta$ -D-xyI) y  $K_M$  aparente de 92  $\mu$ M,  $k_{cat}$  de 51,36 s<sup>-1</sup> y  $K_i$  de 21,1 mM para el sustrato donador (UDP-Gal).
3. Se ha desarrollado un sistema sintético para la obtención de 3-amidopropil xilopiranosídeos mediante la formación de un enlace amido entre un haluro/anhídrido de ácido y el fragmento aglicónico de 3-aminopropanol del

3-aminopropil  $\beta$ -D-xilopiranosido. Se consiguieron rendimientos de entre el 20 y el 100 %, dependiendo del derivado de ácido utilizado.

4. Se ha obtenido el glico-aminoácido  $O_{\gamma}$ - $\beta$ -D-xilopiranosil-*N*-Cbz-*L*-serina-metil éster mediante xilosilación del metil éster de *N*-Cbz-*L*-serina en el grupo hidroxilo en la posición  $\gamma$  del aminoácido. El rendimiento total fue del 52 %.
5. Se ha estudiado la habilidad como sustratos de la B4GALT7 recombinante. Los valores cinéticos obtenidos están en consonancia con lo publicado en la literatura previa. Se ha visto al comparar los xilopiranosidos alifáticos que un aumento de la cadena carbonada se relaciona con una mayor eficacia catalítica. Se ha encontrado un indicio de relación entre la presencia de grupos aromáticos en el aglicón y el aumento de la eficacia catalítica.
6. La capacidad de un xilopiranosido de interferir en la acción de B4GALT7 frente a un sustrato de referencia guarda una cierta relación con la velocidad de transformación del xilopiranosido frente a B4GALT7. El tipo de competición que se da entre los dos productos corresponde a un modelo de inhibición competitiva.
7. Se ha comprobado la actividad antiproliferante de varios de los xilopiranosidos sintetizados frente a la línea celular A 549 de carcinoma pulmonar, midiendo la  $IC_{50}$  frente al crecimiento celular. La mayoría de los compuestos mostraron una capacidad antiproliferante similar a la del 2-(6-hidroxinaftil)  $\beta$ -D-xilopiranosido. Por otro lado, no parece existir ninguna relación entre éstas y sus actividades frente a B4GALT7. Sí se encontró que los xilopiranosidos que no mostraron actividad antiproliferante son malos sustratos de B4GALT7.

## **Bibliografía**



- Almeida, R.; Levery, S. B.; Mandel, U.; Kresse, H.; Schwientek, T.; Bennett, E. P. y Clausen, H. (1999). «Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:  $\beta$ -xylose  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human  $\beta$ 4-galactosyltransferase gene family», *J. Biol. Chem.* **274**: 26165-26171.
- Aikawa, J.-i. y Esko, J. D. (1999). «Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase family», *J. Biol. Chem.* **274**: 2690-2695.
- Aikawa, J.-i.; Grobe, K.; Tsujimoto, M. y Esko, J. D. (2001). «Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc *N*-deacetylase/GlcN *N*-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4», *J. Biol. Chem.* **276**: 5876-5882.
- Amado, M.; Almeida, R.; Schwientek, T. y Clausen, H. (1999). «Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions», *Biochim. Biophys. Acta* **1473**: 35-53.
- Antonsson, P.; Heinegård, D. y Oldberg, Å. (1993). «Structure and deduced amino acid sequence of the human fibromodulin gene», *Biochim. Biophys. Acta* **1174**: 204-206.

- Arnau, J.; Lauritzen, C.; Petersen, G. E. y Pedersen, J. (2006). «Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins», *Protein Expr. Purif.* **48**: 1-13.
- Arneson, L. S. y Miller, J. (2007). «The chondroitin sulfate form of invariant chain trimerizes with conventional invariant chain and these complexes are rapidly transported from the trans-Golgi network to the cell surface», *Biochem. J.* **406**: 97-103.
- Bach, H.; Mazor, Y.; Shaky, S.; Shoham-Lev, A.; Berdichevsky, Y.; Gutnick, D. L. y Benhar, I. (2001). «*Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies», *J. Mol. Biol.* **312**: 79-93.
- Bai, X.; Wei, G.; Sinha, A. y Esko, J. D. (1999). «Chinese hamster ovary cell mutants defective in glycosaminoglycan assembly and glucuronosyltransferase I», *J. Biol. Chem.* **274**: 13017-13024.
- Bai, X.; Zhou, D.; Brown, J. R.; Crawford, B. E.; Hennet, T. y Esko, J. D. (2001). «Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans. Cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase family ( $\beta$ 3GalT6)», *J. Biol. Chem.* **276**: 48189-48195.
- Bame, K. J. (2001). «Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans», *Glycobiology* **11**: 91R-9.
- Bastida, A.; Fernández-Mayoralas, A.; Gómez Arrayás, R.; Iradier, F.; Carretero, J. C. y García-Junceda, E. (2001). «Heterologous over-expression of  $\alpha$ -1,6-fucosyltransferase from *Rhizobium sp.*: Application to the synthesis of the trisaccharide  $\beta$ -D-GlcNAc(1,4)-[ $\alpha$ -L-Fuc-(1,6)]-D-GlcNAc, study of the acceptor specificity and evaluation of polyhydroxylated indolizidines as inhibitors», *Chem. Eur. J.* **7**: 2390-2397.
- Bastida, A.; Latorre, M. y García-Junceda, E. (2003). «*In vivo* chaperone-assisted folding of  $\alpha$ -1,6-fucosyltransferase from *Rhizobium sp.*», *ChemBioChem* **4**: 531-533.

- Belting, M.; Borsig, L.; Fuster, M. M.; Brown, J. R.; Persson, L.; Fransson, L.-Å. y Esko, J. D. (2002). «Tumor attenuation by combined heparan sulfate and polyamine depletion», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 371-376.
- Bengtsson, E.; Neame, P. J.; Heinegård, D. y Sommarin, Y. (1995). «The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues», *J. Biol. Chem.* **270**: 25639-25644.
- Berliner, L. J.; Davis, M. E.; Ebner, K. E.; Beyer, T. A. y Bell, J. E. (1984). «The lactose synthase acceptor site: a structural map derived from acceptor studies», *Mol. Cell. Biochem.* **62**: 37-42.
- Berndt, C.; Casaroli-Marano, R. P.; Vilaró, S. y Reina, M. (2001). «Cloning and characterization of human syndecan-3», *J. Cell. Biochem.* **82**: 246-259.
- Bielicki, J.; Freeman, C.; Clements, P. R. y Hopwood, J. J. (1990). «Human liver iduronate-2-sulphatase. Purification, characterization and catalytic properties», *Biochem. J.* **271**: 75-86.
- Brown, T. A.; Bouchard, T.; St. John, T.; Wayner, E. y Carter, W. G. (1991). «Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons», *J. Cell Biol.* **113**: 207-221.
- Busse, M. y Kusche-Gullberg, M. (2003). «*In vitro* polymerization of heparan sulfate backbone by the EXT proteins», *J. Biol. Chem.* **278**: 41333-41337.
- Busse, M.; Feta, A.; Presto, J.; Wilén, M.; Grønning, M.; Kjellén, L. y Kusche-Gullberg, M. (2007). «Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation», *J. Biol. Chem.* **282**: 32802-32810.
- Campbell, S. C. y Schwartz, N. B. (1988). «Kinetics of intracellular processing of chondroitin sulfate proteoglycan core protein and other matrix components», *J. Cell Biol.* **106**: 2191-2202.
- Carey, D. J.; Crumblin, D. M.; Stahl, R. C. y Evans, D. M. (1990). «Association of cell surface heparan sulfate proteoglycans of Schwann cells with extracellular matrix proteins», *J. Biol. Chem.* **265**: 20627-20633.
- Carrera Casanova, J.; Kuhn, J.; Kleesiek, K. y Göttin, C. (2008). «Heterologous expression and biochemical characterization of soluble human xylosyltransferase II », *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**: 678-684.

- Chakravarti, S.; Stallings, R. L.; SundarRaj, N.; Cornuet, P. K. y Hassell, J. R. (1995). «Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22», *Genomics* **27**: 481-488.
- Cheng, F.; Heinegård, D.; Malmström, A.; Schmidtchen, A.; Yoshida, K. y Fransson, L.-Å. (1994). «Patterns of uronosyl epimerization and 4-/6-O-sulphation in chondroitin/dermatan sulphate from decorin and biglycan of various bovine tissues», *Glycobiology* **4**: 685-696.
- Clements, P. R.; Brooks, D. A.; McCourt, P. A. y Hopwood, J. J. (1989). «Immunopurification and characterization of human  $\alpha$ -L-iduronidase with the use of monoclonal antibodies», *Biochem. J.* **259**: 199-208.
- Coombe, D. R. y Kett, W. C. (2005). «Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights», *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 410-424.
- Cornish-Bowden, A. (2004). *Fundamentals of enzyme kinetics*. 3ª ed. Londres: Portland Press.
- Crawford, B. E.; Olson, S. K.; Esko, J. D. y Pinhal, M. A. S. (2001). «Cloning, Golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid C5-epimerase», *J. Biol. Chem.* **276**: 21538-21543.
- Csóka, A. B.; Scherer, S. W. y Stern, R. (1999). «Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31», *Genomics* **60**: 356-361.
- Daligault, F.; Rahuel-clermont, S.; Gulberti, S.; Cung, M.-T.; Branlant, G.; Netter, P.; Magdalou, J. y Lattard, V. (2009). «Thermodynamic insights into the structural basis governing the donor substrate recognition by human  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7», *Biochem. J.* **418**: 605-614.
- David, G.; Lories, V.; Decock, B.; Marynen, P.; Cassiman, J. J. y Van den Berghe, H. (1990). «Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts», *J. Cell Biol.* **111**: 3165-3176.
- David, G.; van der Schueren, B.; Marynen, P.; Cassiman, J. J. y van den Berghe, H. (1992). «Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan



- sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells», *J. Cell Biol.* **118**: 961-969.
- Deere, M.; Johnson, J.; Garza, S.; Harrison, W. R.; Yoon, S.-J.; Elder, F. F. B.; Kucherlapati, R.; Hook, M. y Hecht, J. T. (1996). «Characterization of human DSPG3, a small dermatan sulfate proteoglycan», *Genomics* **38**: 399-404.
- Dixon, J.; Loftus, S. K.; Gladwin, A. J.; Scambler, P. J.; Wasmuth, J. J. y Dixon, M. J. (1995). «Cloning of the human heparan sulfate-*N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase gene from the treacher Collins syndrome candidate region at 5q32-q33.1», *Genomics* **26**: 239-244.
- Doege, K. J.; Sasaki, M.; Kimura, T. y Yamada, Y. (1991). «Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms», *J. Biol. Chem.* **266**: 894-902.
- Dong, S.; Cole, G. J. y Halfter, W. (2003). «Expression of collagen XVIII and localization of its glycosaminoglycan attachment sites», *J. Biol. Chem.* **278**: 1700-1707.
- Dougherty, G. J.; Landorp, P. M.; Cooper, D. L. y Humphries, R. K. (1991). «Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells», *J. Exp. Med.* **174**: 1-5.
- Duncan, G.; McCormick, C. y Tufaro, F. (2001). «The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins», *J. Clin. Invest.* **108**: 511-516.
- Dwek, R. A. (1996). «Glycobiology: Toward understanding the function of sugars», *Chem. Rev.* **96**: 683-720.
- Edgren, G.; Havsmark, B.; Jönsson, M. y Fransson, L.-Å. (1997). «Glypican (heparan sulfate proteoglycan) is palmitoylated, deglycanated and reglycanated during recycling in skin fibroblasts», *Glycobiology* **7**: 103-112.
- Egeberg, M.; Kjekens, R.; Kolset, S. O.; Berg, T. y Prydz, K. (2001). «Internalization and stepwise degradation of heparan sulfate proteoglycans in rat hepatocytes», *Biochim. Biophys. Acta* **1541**: 135-149.

- Enerbäck, L.; Kolset, S. O.; Kusche, M.; Hjerpe, A. y Lindahl, U. (1985). «Glycosaminoglycans in rat mucosal mast cells», *Biochem. J.* **227**: 661-668.
- Esko, J. D. y Lindahl, U. (2001). «Molecular diversity of heparan sulfate», *J. Clin. Invest.* **108**: 169-173.
- Esko, J. D. y Selleck, S. B. (2002). «Order out of chaos: Assembly of ligand binding sites in heparan sulfate», *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 435-471.
- Esko, J. D. y Zhang, L. (1996). «Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly», *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**: 663-670.
- Esko, J. D.; Kimata, K. y Lindahl, U. (2009). «Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans», en *Essentials of glycobiology* (A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart y M. E. Etzler, eds.), 2ª ed. La Jolla, California: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Esposito, D. y Chatterjee, D. K. (2006). «Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags», *Curr. Opin Biotechnol.* **17**: 353-358.
- Evers, M. R.; Xia, G.; Kang, H.-G.; Schachner, M. y Baenziger, J. U. (2001). «Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific *N*-acetylgalactosamine 4-*O*-sulfotransferase», *J. Biol. Chem.* **276**: 36344-36353.
- Fahnert, B.; Lilie, H. y Neubauer, P. (2004). «Inclusion Bodies: Formation and Utilisation», en *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*, ed. Heidelberg: Springer Berlin.
- Fan, G.; Xiao, L.; Cheng, L.; Wang, X.; Sun, B. y Hu, G. (2000). «Targeted disruption of NDST-1 gene leads to pulmonary hypoplasia and neonatal respiratory distress in mice», *FEBS Lett.* **467**: 7-11.
- Fan, X.; Zhang, H.; Zhang, S.; Bagshaw, R. D.; Tropak, M. B.; Callahan, J. W. y Mahuran, D. J. (2006). «Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C)», *Am. J. Hum. Gen.* **79**: 738-744.
- Farach-Carson, M. C. y Carson, D. D. (2007). «Perlecan a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold», *Glycobiology* **17**: 897-905.

- Fedarko, N. S. y Conrad, H. E. (1986). «A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: structural changes with the growth state of the cells», *J. Cell Biol.* **102**: 587-599.
- Ferro, D. R.; Provasoli, A.; Ragazzi, M.; Casu, B.; Torri, G.; Bossennec, V.; Perly, B.; Sinaÿ, P.; Petitou, M. y Choay, J. (1990). «Conformer populations of L-iduronic acid residues in glycosaminoglycan sequences», *Carbohydrate Res.* **195**: 157-167.
- Filmus, J. y Selleck, S. B. (2001). «Glypicans: proteoglycans with a surprise», *J. Clin. Invest.* **108**: 497–501.
- Fisher, L. W.; Termine, J. D. y Young, M. F. (1989). «Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species», *J. Biol. Chem.* **264**: 4571-4576.
- Fondeur-Gelinotte, M.; Lattard, V.; Gulberti, S.; Oriol, R.; Mulliert, G.; Coughtrie, M. W. H.; Magdalou, J.; Netter, P.; Ouzzine, M. y Fournel-Gigleux, S. (2007). «Molecular basis for acceptor substrate specificity of the human  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferases GlcAT-I and GlcAT-P involved in glycosaminoglycan and HNK-1 carbohydrate epitope biosynthesis, respectively», *Glycobiology* **17**: 857–867.
- Forsberg, E.; Pejler, G.; Ringvall, M.; Lunderius, C.; Tomasini-Johansson, B.; Kusche-Gullberg, M.; Eriksson, I.; Ledin, J.; Hellman, L. y Kjellén, L. (1999). «Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme», *Nature* **400**: 773-776.
- Fransson, L.-Å.; Silverberg, I. y Carlstedt, I. (1985). «Structure of the heparan sulfate-protein linkage region. Demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate», *J. Biol. Chem.* **260**: 14722-14726.
- Fransson, L.-Å.; Karlsson, P. y Schmidtchen, A. (1992). «Effects of cycloheximide, brefeldin A, suramin, heparin and primaquine on proteoglycan and glycosaminoglycan biosynthesis in human embryonic skin fibroblasts», *Biochim. Biophys. Acta* **1137**: 287-297.

- Fransson, L.-Å.; Belting, M.; Jönsson, M.; Mani, K.; Moses, J. y Oldberg, Å. (2000). «Biosynthesis of decorin and glypican», *Matrix Biol.* **19**: 367-376.
- Freeze, H. H. (2009). «Genetic disorders of glycan degradation», en *Essentials of glycobiology* (A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart y M. E. Etzler, eds.), 2ª ed. La Jolla, California: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Freeze, H. H.; Sampath, D. y Varki, A. (1993). « $\alpha$ - and  $\beta$ -xylosides alter glycolipid synthesis in human melanoma and Chinese hamster ovary cells», *J. Biol. Chem.* **268**: 1618-1627.
- French, M. M.; Smith, S. E.; Akanbi, K.; Sanford, T.; Hecht, J.; Farach-Carson, M. C. y Carson, D. D. (1999). «Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity *in vitro*», *J. Cell Biol.* **145**: 1103-1115.
- Fritz, T. A.; Lagemwa, F. N.; Sarkar, A. K. y Esko, J. D. (1994a). «Biosynthesis of heparan sulfate on  $\beta$ -D-xylosides depends on aglycone structure», *J. Biol. Chem.* **269**: 300-307.
- Fritz, T. A.; Gabb, M. M.; Wei, G. y Esko, J. D. (1994b). «Two *N*-acetylglucosaminyl-transferases catalyze the biosynthesis of heparan sulfate», *J. Biol. Chem.* **269**: 28809-28814.
- Fritz, T. A.; Agrawal, P. K.; Esko, J. D. y Krishna, N. R. (1997). «Partial purification and substrate specificity of heparan sulfate  $\alpha$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase I: synthesis, NMR spectroscopic characterization and *in vitro* assays of two aryl tetrasaccharides», *Glycobiology* **7**: 587-c-595.
- Fuki, I. V.; Kuhn, K. M.; Lomazov, I. R.; Rothman, V. L.; Tuszyński, G. P.; Iozzo, R. V.; Swenson, T. L.; Fisher, E. A. y Williams, K. J. (1997). «The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins *in vitro*», *J. Clin. Invest.* **100**: 1611-1622.
- Funderburgh, J. L. (2000). «Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function», *Glycobiology* **10**: 951-958.
- Gary, S. C.; Zerillo, C. A.; Chiang, V. L.; Gaw, J. U.; Gray, G. y Hockfield, S. (2000). «cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human

- BEHAB/brevican*, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma», *Gene* **256**: 139-147.
- Gibson, K. D.; Doller, H. J. y Hoar, R. M. (1978). « $\beta$ -D-Xylosides cause abnormalities of growth and development in chick embryos», *Nature* **273**: 151-154.
- Gotoh, M.; Yada, T.; Sato, T.; Akashima, T.; Iwasaki, H.; Mochizuki, H.; Inaba, N.; Togayachi, A.; Kudo, T.; Watanabe, H.; Kimata, K. y Narimatsu, H. (2002a). «Molecular cloning and characterization of a novel chondroitin sulfate glucuronyltransferase that transfers glucuronic acid to *N*-acetylgalactosamine», *J. Biol. Chem.* **277**: 38179-38188.
- Gotoh, M.; Sato, T.; Akashima, T.; Iwasaki, H.; Kameyama, A.; Mochizuki, H.; Yada, T.; Inaba, N.; Zhang, Y.; Kikuchi, N.; Kwon, Y.-D.; Togayachi, A.; Kudo, T.; Nishihara, S.; Watanabe, H.; Kimata, K. y Narimatsu, H. (2002b). «Enzymatic synthesis of chondroitin with a novel chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyltransferase that transfers *N*-acetylgalactosamine to glucuronic acid in initiation and elongation of chondroitin sulfate synthesis», *J. Biol. Chem.* **277**: 38189-38196.
- Götting, C.; Kuhn, J.; Zahn, R.; Brinkmann, T. y Kleesiek, K. (2000). «Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose:proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase and its first isoform XT-II», *J. Mol. Biol.* **304**: 517-528.
- Groffen, A. J. A.; Buskens, C. A. F.; Kuppevelt, T. H. v.; Veerkamp, J. H.; Monnens, L. A. H. y van den Heuvel, L. P. W. J. (1998). «Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney», *Eur. J. Biochem.* **254**: 123-128.
- Grover, J.; Chen, X.-N.; Korenberg, J. R. y Roughley, P. J. (1995). «The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage», *J. Biol. Chem.* **270**: 21942-21949.
- Gulberti, S.; Lattard, V.; Fondeur, M.; Jacquinet, J.-C.; Mulliert, G.; Netter, P.; Magdalou, J.; Ouzzine, M. y Fournel-Gigleux, S. (2005). «Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and  $\beta$ 1,3-glucuronosyl transferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans», *J. Biol. Chem.* **280**: 1417-1425.

- Gupta, R. y Brunak, S. (2002). «Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function», *Pac. Symp. Biocomput.* **7**: 310-322.
- Habuchi, O. (2000). «Diversity and functions of glycosaminoglycan sulfotransferases», *Biochim. Biophys. Acta* **1474**: 115-127.
- Habuchi, H.; Kobayashi, M. y Kimata, K. (1998). «Molecular characterization and expression of heparan-sulfate 6-sulfotransferase», *J. Biol. Chem.* **273**: 9208-9213.
- Habuchi, H.; Tanaka, M.; Habuchi, O.; Yoshida, K.; Suzuki, H.; Ban, K. y Kimata, K. (2000). «The occurrence of three isoforms of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase having different specificities for hexuronic acid adjacent to the targeted N-sulfoglucosamine», *J. Biol. Chem.* **275**: 2859-2868.
- Habuchi, H.; Miyake, G.; Nogami, K.; Kuroiwa, A.; Matsuda, Y.; Kusche-Gullberg, M.; Habuchi, O.; Tanaka, M. y Kimata, K. (2003). «Biosynthesis of heparan sulphate with diverse structures and functions: two alternatively spliced forms of human heparan sulphate 6-O-sulphotransferase-2 having different expression patterns and properties», *Biochem. J.* **371**: 131-142.
- Häcker, U.; Nybakken, K. y Perrimon, N. (2005). «Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 530-541.
- Hagopian, A. y Eylar, E. H. (1968). «Glycoprotein biosynthesis: Studies on the receptor specificity of the polypeptidyl: N-acetylgalactosaminyl transferase from bovine submaxillary glands», *Arch. Biochem. Biophys.* **128**: 422-433.
- Halfter, W.; Dong, S.; Schurer, B. y Cole, G. J. (1998). «Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan», *J. Biol. Chem.* **273**: 25404-25412.
- Hascall, V. y Esko, J. D. (2009). «Hyaluronan», en *Essentials of glycobiology* (A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart y M. E. Etzler, eds.), 2ª ed. La Jolla, California: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Helting, T. y Rodén, L. (1969). «Biosynthesis of chondroitin sulfate. I. Galactosyl transfer in the formation of the carbohydrate-protein linkage region», *J. Biol. Chem.* **244**: 2790-2798.

- Hennet, T. (2002). «The galactosyltransferase family», *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1081-1095.
- Herzig, J.; Nudelman, A.; Gottlieb, H. E. y Fischer, B. (1986). «Studies in sugar chemistry. 2. A simple method for O-deacylation of polyacylated sugars», *J. Org. Chem.* **51**: 727-730.
- Hiraoka, N.; Nakagawa, H.; Ong, E.; Akama, T. O.; Fukuda, M. N. y Fukuda, M. (2000). «Molecular cloning and expression of two distinct human chondroitin 4-O-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family», *J. Biol. Chem.* **275**: 20188-20196.
- Hřebíček, M.; Mrázová, L.; Seyrantepe, V.; Durand, S.; Roslin, N. M.; Nosková, L.; Hartmannová, H.; Ivánek, R.; Čížková, A.; Poupětová, H.; Sikora, J.; Uřínovská, J.; Stránecký, V.; Zeman, J.; Lepage, P.; Roquis, D.; Verner, A.; Ausseil, J.; Beesley, C. E.; Maire, I.; Poorthuis, B. J. H. M.; van de Kamp, J.; van Diggelen, O. P.; Wevers, R. A.; Hudson, T. J.; Fujiwara, T. M.; Majewski, J.; Morgan, K.; Kmoch, S. y Pshezhetsky, A. V. (2006). «Mutations in *TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome)», *Am. J. Hum. Gen.* **79**: 807-819.
- Humphries, D. E.; Nicodemus, C. F.; Schiller, V. y Stevens, R. L. (1992). «The human serglycin gene. Nucleotide sequence and methylation pattern in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and T-lymphoblast Molt-4 cells», *J. Biol. Chem.* **267**: 13558-13563.
- Humphries, D. E.; Lanciotti, J. y Karlinsky, J. B. (1998). «cDNA cloning, genomic organization and chromosomal localization of human heparan glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferase-2», *Biochem. J.* **332**: 303-307.
- Humphries, D. E.; Wong, G. W.; Friend, D. S.; Gurish, M. F.; Qiu, W.-T.; Huang, C.; Sharpe, A. H. y Stevens, R. L. (1999). «Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells», *Nature* **400**: 769-772.
- Iozzo, R. V. (1987). «Turnover of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. A quantitative biochemical and autoradiographic study», *J. Biol. Chem.* **262**: 1888-1900.

- Iozzo, R. V. (1999). «The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins», *J. Biol. Chem.* **274**: 18843-18846.
- Iozzo, R. V. y Hassell, J. R. (1989). «Identification of the precursor protein for the heparan sulfate proteoglycan of human colon carcinoma cells and its post-translational modifications», *Arch. Biochem. Biophys.* **269**: 239-249.
- Irimura, T.; Nakajima, M. y Nicolson, G. L. (1986). «Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo- $\beta$ -glucuronidase (heparanase) of metastatic melanoma cells», *Biochemistry* **25**: 5322-5328.
- Ishida, K.; Wierzbicka, M. K.; Teruya, T.; Simizu, S. y Osada, H. (2004). «Novel heparan sulfate mimetic compounds as antitumor agents», *Chem. Biol.* **11**: 367-377.
- Itakura, K.; Hirose, T.; Crea, R.; Riggs, A. D.; Heyneker, H. L.; Bolivar, F. y Boyer, H. W. (1977). «Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin», *Science* **198**: 1056-1063.
- Izumikawa, T.; Uyama, T.; Okuura, Y.; Sugahara, K. y Kitagawa, H. (2007). «Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin-polymerizing factor», *Biochem. J.* **403**: 545-552.
- Izumikawa, T.; Koike, T.; Shiozawa, S.; Sugahara, K.; Tamura, J.-i. y Kitagawa, H. (2008). «Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization», *J. Biol. Chem.* **283**: 11396-11406.
- Jacobsson, I. y Lindahl, U. (1980). «Biosynthesis of heparin. Concerted action of late polymer-modification reactions», *J. Biol. Chem.* **255**: 5094-5100.
- Jacobsson, M.; Ellervik, U.; Belting, M. y Mani, K. (2006). «Selective antiproliferative activity of hydroxynaphthyl- $\beta$ -D-xylosides», *J. Med. Chem.* **49**: 1932-1938.
- Jacobsson, M.; Mani, K. y Ellervik, U. (2007). «Effects of oxygen-sulfur substitution on glycosaminoglycan-priming naphthoxylosides», *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 5283-5299.
- Johnston, L. S. y Keller, J. M. (1979). «The effect of  $\beta$ -xylosides on heparan sulfate synthesis by SV40-transformed Swiss mouse 3T3 cells», *J. Biol. Chem.* **254**: 2575-2578.



- Johnsson, R.; Mani, K. y Ellervik, U. (2007). «Synthesis and biology of bis-xylosylated dihydroxynaphthalenes», *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 2868-2877.
- Joziassse, D. H. (1992). «Mammalian glycosyltransferases: genomic organization and protein structure», *Glycobiology* **2**: 271-277.
- Kallunki, P. y Tryggvason, K. (1992). «Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor», *J. Cell Biol.* **116**: 559-571.
- Kang, H.-G.; Evers, M. R.; Xia, G.; Baenziger, J. U. y Schachner, M. (2002). «Molecular cloning and characterization of chondroitin-4-O-sulfotransferase-3. A novel member of the HNK-1 family of sulfotransferases», *J. Biol. Chem.* **277**: 34766-34772.
- Kato, M.; Wang, H.; Bernfield, M.; Gallagher, J. T. y Turnbull, J. E. (1994). «Cell surface syndecan-1 on distinct cell types differs in fine structure and ligand binding of its heparan sulfate chains», *J. Biol. Chem.* **269**: 18881-18890.
- Kaul, S. C.; Sugihara, T.; Yoshida, A.; Nomura, H. y Wadhwa, R. (2000). «Gros1, a potential growth suppressor on chromosome 1: its identity to basement membrane-associated proteoglycan, leprecan», *Oncogene* **19**: 3576-3583.
- Kjellén, L. y Lindahl, U. (1991). «Proteoglycans: structures and interactions», *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 443-475.
- Kim, C. W.; Goldberger, O. A.; Gallo, R. L. y Bernfield, M. (1994). «Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns», *Mol. Biol. Cell.* **5**: 797-805.
- Kim, B.-T.; Kitagawa, H.; Tamura, J.-i.; Saito, T.; Kusche-Gullberg, M.; Lindahl, U. y Sugahara, K. (2001). «Human tumor suppressor *EXT* gene family members *EXTL1* and *EXTL3* encode  $\alpha$ 1,4-*N*-acetylglucosaminyl-transferases that likely are involved in heparan sulfate/heparin biosynthesis», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7176-7181.
- Kim, B.-T.; Kitagawa, H.; Tanaka, J.; Tamura, J.-i. y Sugahara, K. (2003). «*In vitro* heparan sulfate polymerization. Crucial roles of core protein moieties of primer

substrates in addition to the EXT1-EXT2 interaction», *J. Biol. Chem.* **278**: 41618-41623.

Kimura, J. H.; Hardingham, T. E.; Hascall, V. C. y Solursh, M. (1979). «Biosynthesis of proteoglycans and their assembly into aggregates in cultures of chondrocytes from the Swarm rat chondrosarcoma», *J. Biol. Chem.* **254**: 2600-2609.

Kinoshita, S. y Saiga, H. (1979). «The role of proteoglycan in the development of sea urchins: I. Abnormal development of sea urchin embryos caused by the disturbance of proteoglycan synthesis», *Exp. Cell Res.* **123**: 229-236.

Kisilevsky, R.; Szarek, W. A.; Ancsin, J.; Vohra, R.; Li, Z. y Marone, S. (2004). «Novel glycosaminoglycan precursors as antiamyloid agents. IV», *J. Mol. Neurosci.* **24**: 167-172.

Kitagawa, H.; Tanaka, Y.; Tsuchida, K.; Goto, F.; Ogawa, T.; Lidholt, K.; Lindahl, U. y Sugahara, K. (1995). «N-acetylgalactosamine (GalNAc) transfer to the common carbohydrate-protein linkage region of sulfated glycosaminoglycans», *J. Biol. Chem.* **270**: 22190-22195.

Kitagawa, H.; Tsutsumi, K.; Ujikawa, M.; Goto, F.; Tamura, J.-i.; Neumann, K. W.; Ogawa, T. y Sugahara, K. (1997). «Regulation of chondroitin sulfate biosynthesis by specific sulfation: acceptor specificity of serum  $\beta$ -GalNAc transferase revealed by structurally defined oligosaccharides», *Glycobiology* **7**: 531-537.

Kitagawa, H.; Tone, Y.; Tamura, J.-i.; Neumann, K. W.; Ogawa, T.; Oka, S.; Kawasaki, T. y Sugahara, K. (1998). «Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans», *J. Biol. Chem.* **273**: 6615-6618.

Kitagawa, H.; Shimakawa, H. y Sugahara, K. (1999). «The tumor suppressor *EXT*-like gene *EXTL2* encodes an  $\alpha$ 1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate», *J. Biol. Chem.* **274**: 13933-13937.

Kitagawa, H.; Fujita, M.; Ito, N. y Sugahara, K. (2000). «Molecular cloning and expression of a novel chondroitin 6-O-sulfotransferase», *J. Biol. Chem.* **275**: 21075-21080.

- Kitagawa, H.; Uyama, T. y Sugahara, K. (2001). «Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase», *J. Biol. Chem.* **276**: 38721-38726.
- Kitagawa, H.; Izumikawa, T.; Uyama, T. y Sugahara, K. (2003). «Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization», *J. Biol. Chem.* **278**: 23666-23671.
- Kjellén, L. y Lindahl, U. (1991). «Proteoglycans: structures and interactions», *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 443-475.
- Kleeff, J.; Wildi, S.; Kumbasar, A.; Friess, H.; Lander, A. D. y Korc, M. (1999). «Stable transfection of a glypican-1 antisense construct decreases tumorigenicity in PANC-1 pancreatic carcinoma cells», *Pancreas* **19**: 281-288.
- Kobayashi, M.; Habuchi, H.; Yoneda, M.; Habuchi, O. y Kimata, K. (1997). «Molecular cloning and expression of chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase», *J. Biol. Chem.* **272**: 13980-13985.
- Kobayashi, M.; Sugumaran, G.; Liu, J.; Shworak, N. W.; Silbert, J. E. y Rosenberg, R. D. (1999). «Molecular cloning and characterization of a human uronil 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate», *J. Biol. Chem.* **274**: 10474-10480.
- Koda, J. E.; Rapraeger, A. y Bernfield, M. (1985). «Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens», *J. Biol. Chem.* **260**: 8157-8162.
- Kojima, T.; Shworak, N. W. y Rosenberg, R. D. (1992). «Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line», *J. Biol. Chem.* **267**: 4870-4877.
- Kolset, S. O.; Sakurai, K.; Ivhed, I.; Øvervatn, A. y Suzuki, S. (1990). «The effect of  $\beta$ -D-xylosides on the proliferation and proteoglycan biosynthesis of monoblastic U-937 cells», *Biochem. J.* **265**: 637-645.
- Koopmann, W.; Ediriwickrema, C. y Krangel, M. S. (1999). «Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage-inflammatory protein-1 $\beta$ », *J. Immunol.* **163**: 2120-2127.
- Korneluk, R. G.; Mahuran, D. J.; Neote, K.; Klavins, M. H.; O'Dowd, B. F.; Tropak, M.; Willard, H. F.; Anderson, M. J.; Lowden, J. A. y Gravel, R. A. (1986). «Isolation of

- cDNA clones coding for the  $\alpha$ -subunit of human  $\beta$ -hexosaminidase. Extensive homology between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits and studies on Tay-Sachs disease», *J. Biol. Chem.* **261**: 8407-8413.
- de Kort, M.; Buijsman, R. C. y van Boeckel, C. A. A. (2005). «Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs», *Drug Discov. Today* **10**: 769-779.
- Krusius, T. y Ruoslahti, E. (1986). «Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 7683-7687.
- Krusius, T.; Gehlsen, K. R. y Ruoslahti, E. (1987). «A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences», *J. Biol. Chem.* **262**: 13120-13125.
- Kuhn, J.; Götting, C.; Schnölzer, M.; Kempf, T.; Brinkmann, T. y Kleesiek, K. (2001). «First isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells», *J. Biol. Chem.* **276**: 4940-4947.
- Kusche-Gullberg, M. y Kjellén, L. (2003). «Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis», *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 605-611.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982). «A simple method for displaying the hydropathic character of a protein», *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Ladner, C. L.; Yang, J.; Turner, R. J. y Edwards, R. A. (2004). «Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining», *Anal. Biochem.* **326**: 13-20.
- Lage, H. y Dietel, M. (1997). «Cloning and characterization of human cDNAs encoding a protein with high homology to rat intestinal development protein OCI-5», *Gene* **188**: 151-156.
- Lark, M. W. y Culp, L. A. (1984). «Turnover of heparan sulfate proteoglycans from substratum adhesion sites of murine fibroblasts», *J. Biol. Chem.* **259**: 212-217.
- Latorre, M. (2008). *Obtención y caracterización bioquímica de un enzima de resistencia a antibióticos aminoglicósidos: 6-adeniltransferasa de Bacillus subtilis*. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.

- Lawrence, R.; Yabe, T.; HajMohammadi, S.; Rhodes, J.; McNeely, M.; Liu, J.; Lamperti, E. D.; Toselli, P. A.; Lech, M.; Spear, P. G.; Rosenberg, R. D. y Shworak, N. W. (2007). «The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues», *Matrix Biol.* **26**: 442-455.
- Ledin, J.; Staatz, W.; Li, J.-P.; Götte, M.; Selleck, S.; Kjellén, L. y Spillmann, D. (2004). «Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production», *J. Biol. Chem.* **279**: 42732-42741.
- Ledin, J.; Ringvall, M.; Thuveson, M.; Eriksson, I.; Wilén, M.; Kusche-Gullberg, M.; Forsberg, E. y Kjellén, L. (2006). «Enzymatically active *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-2 is present in liver but does not contribute to heparan sulfate *N*-sulfation», *J. Biol. Chem.* **281**: 35727-35734.
- Leloir, L. F. (1972). «Two decades of research on the biosynthesis of saccharides», en *Nobel Lectures, Chemistry 1963-1970*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company.
- Lepperdinger, G.; Strobl, B. y Kreil, G. (1998). «*HYAL2*, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity», *J. Biol. Chem.* **273**: 22466-22470.
- Levitt, D. y Dorfman, A. (1973). «Control of chondrogenesis in limb-bud cell cultures by bromodeoxyuridine», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**: 2201-2205.
- Levy, J. B.; Canoll, P. D.; Silvennoinen, O.; Barnea, G.; Morse, B.; Honegger, A. M.; Huang, J. T.; Cannizzaro, L. A.; Park, S. H. y Druck, T. (1993). «The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system», *J. Biol. Chem.* **268**: 10573-10581.
- Lidholt, K. y Lindahl, U. (1992). «Biosynthesis of heparin. The  $\beta$ -glucuronosyl- and *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminyltransferase reactions and their relation to polymer modification», *Biochem. J.* **287**: 21-29.
- Lidholt, K.; Kjellén, L. y Lindahl, U. (1989). «Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes», *Biochem. J.* **261**: 999-1007.
- Lidholt, K.; Fjelstad, M.; Lindahl, U.; Goto, F.; Ogawa, T.; Kitagawa, H. y Sugahara, K. (1997). «Assessment of glycosaminoglycan-protein linkage tetrasaccharides as

- acceptors for GalNAc- and GlcNAc-transferases from mouse mastocytoma», *Glycoconj. J.* **14**: 737-742.
- Lin, X. H.; Grako, K. A.; Burg, M. A. y Stallcup, W. B. (1996). «NG2 proteoglycan and the actin-binding protein fascin define separate populations of actin-containing filopodia and lamellipodia during cell spreading and migration», *Mol. Biol. Cell* **7**: 1977-1993.
- Lind, T.; Tufaro, F.; McCormick, C.; Lindahl, U. y Lidholt, K. (1998). «The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate», *J. Biol. Chem.* **273**: 26265-26268.
- Lind, T.; Lindahl, U. y Lidholt, K. (1993). «Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. Identification of a 70-kDa protein catalyzing both the D-glucuronosyl- and the N-acetyl-D-glucosaminyltransferase reactions», *J. Biol. Chem.* **268**: 20705-20708.
- Lindahl, U. y Rodén, L. (1965). «The role of galactose and xylose in the linkage of heparin to protein», *J. Biol. Chem.* **240**: 2821-2826.
- Lindahl, U. y Rodén, L. (1966). «The chondroitin 4-sulfate-protein linkage», *J. Biol. Chem.* **241**: 2113-2119.
- Linhardt, R. J. y Toida, T. (2004). «Role of glycosaminoglycans in cellular communication», *Acc. Chem. Res.* **37**: 431-438.
- Little, P. J.; Ballinger, M. L.; Burch, M. L. y Osmanab, N. (2008). «Biosynthesis of natural and hyperelongated chondroitin sulfate glycosaminoglycans: new insights into an elusive process», *Open Biochem. J.* **2**: 135-142.
- Liu, W.; Litwack, E. D.; Stanley, M. J.; Langford, J. K.; Lander, A. D. y Sanderson, R. D. (1998). «Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules: syndecans and glypican have distinct functions», *J. Biol. Chem.* **273**: 22825-22832.
- Liu, D.; Shriver, Z.; Venkataraman, G.; El Shabrawi, Y. y Sasisekharan, R. (2002). «Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 568-573.
- Liu, J. y Pedersen, L. (2007). «Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis», *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 263-272.

- Llopis, J.; Mccaffery, J. M.; Miyawaki, A.; Farquhar, M. G. y Tsien, R. Y. (1998). «Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6803-6808.
- López, R. y Fernandez-Mayoralas, A. (1994). «Enzymic  $\beta$ -galactosidation of modified monosaccharides: study of the enzyme selectivity for the acceptor and its application to the synthesis of disaccharides», *J. Org. Chem.* **59**: 737-745.
- Lugemwa, F. N. y Esko, J. D. (1991). «Estradiol  $\beta$ -D-xyloside, an efficient primer for heparan sulfate biosynthesis», *J. Biol. Chem.* **266**: 6674-6677.
- Lugemwa, F. N.; Sarkar, A. K. y Esko, J. D. (1996). «Unusual  $\beta$ -D-xylosides that prime glycosaminoglycans in animal cells», *J. Biol. Chem.* **271**: 19159-19165.
- Maccarana, M.; Sakura, Y.; Tawada, A.; Yoshida, K. y Lindahl, U. (1996). «Domain structure of heparan sulfates from bovine organs», *J. Biol. Chem.* **271**: 17804-17810.
- Maccarana, M.; Olander, B.; Malmström, J.; Tiedemann, K.; Aebersold, R.; Lindahl, U.; Li, J.-p. y Malmström, A. (2006). «Biosynthesis of dermatan sulfate. Chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2», *J. Biol. Chem.* **281**: 11560-11568.
- Madisen, L.; Neubauer, M.; Plowman, G.; Rosen, D.; Segarini, P.; Dasch, J.; Thompson, A.; Ziman, J.; Bentz, H. y Purchio, A. F. (1990). «Molecular cloning of a novel bone-forming compound: Osteoinductive factor», *DNA Cell Biol.* **9**: 303-309.
- Mali, M.; Jaakkola, P.; Arvilommi, A. M. y Jalkanen, M. (1990). «Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans», *J. Biol. Chem.* **265**: 6884-6889.
- Mani, K.; Havsmark, B.; Persson, S.; Kaneda, Y.; Yamamoto, H.; Sakurai, K.; Ashikari, S.; Habuchi, H.; Suzuki, S.; Kimata, K.; Malmstrom, A.; Westergren-Thorsson, G. y Fransson, L.-Å. (1998). «Heparan/chondroitin/ dermatan sulfate primer 2-(6-hydroxynaphthyl)-O- $\beta$ -D-xylopyranoside preferentially inhibits growth of transformed cells», *Cancer Res.* **58**: 1099-1104.
- Mani, K.; Belting, M.; Ellervik, U.; Falk, N.; Svensson, G.; Sandgren, S.; Cheng, F. y Fransson, L. Å. (2004). «Tumor attenuation by 2(6-hydroxynaphthyl)-

$\beta$ -D-xylopyranoside requires priming of heparan sulfate and nuclear targeting of the products», *Glycobiology* **14**: 387-397.

Martin, N. B.; Masson, P.; Sepulchre, C.; Theveniaux, J.; Millet, J.; Bellamy, F. (1996). «Pharmacologic and biochemical profiles of new venous antithrombotic  $\beta$ -D-xyloside derivatives: potential antiathero/thrombotic drugs», *Semin. Thromb. Hemostasis* **22**: 247-254.

Marynen, P.; Zhang, J.; Cassiman, J. J.; Van den Berghe, H. y David, G. (1989). «Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface of human lung fibroblasts», *J. Biol. Chem.* **264**: 7017-7024.

Maurel, P.; Rauch, U.; Flad, M.; Margolis, R. K. y Margolis, R. U. (1994). «Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 2512-2516.

Mazany, K. D.; Peng, T.; Watson, C. E.; Tabas, I. y Williams, K. J. (1998). «Human chondroitin 6-sulfotransferase: cloning, gene structure, and chromosomal localization», *Biochim. Biophys. Acta* **1407**: 92-97.

McCormick, C.; Leduc, Y.; Martindale, D.; Mattison, K.; Esford, L.; Dyer, A. y Tufaro, F. (1998). «The putative tumour suppressor *EXT1* alters the expression of cell-surface heparan sulfate», *Nat. Genet.* **19**: 158-161.

McCormick, C.; Duncan, G.; Goutsos, K. T. y Tufaro, F. (2000). «The putative tumor suppressors *EXT1* and *EXT2* form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 668-673.

Miao, H.-Q.; Fritz, T. A.; Esko, J. D.; Zimmermann, J.; Yayon, A. y Vlodavsky, I. (1995). «Heparan sulfate primed on  $\beta$ -D-xylosides restores binding of basic fibroblast growth factor», *J. Cell. Biochem.* **57**: 173-184.

Miao, H. Q.; Elkin, M.; Aingorn, E.; Ishai-Michaeli, R.; Stein, C. A. y Vlodavsky, I. (1999). «Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin



- sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides», *Int. J. Cancer* **83**: 424-431.
- Morris, C. P.; Guo, X.-H.; Apostolou, S.; Hopwood, J. J. y Scott, H. S. (1994). «Morquio A syndrome: Cloning, sequence, and structure of the human *N*-acetylgalactosamine 6-sulfatase (*GALNS*) gene», *Genomics* **22**: 652-654.
- Moses, J.; Oldberg, Å.; Cheng, F. y Fransson, L.-Å. (1997a). «Biosynthesis of the proteoglycan decorin: Transient 2-phosphorylation of xylose during formation of the trisaccharide linkage region», *Eur. J. Biochem.* **248**: 521-526.
- Moses, J.; Oldberg, Å.; Eklund, E. y Fransson, L.-Å. (1997b). «Biosynthesis of the proteoglycan decorin: Identification of intermediates in galactosaminoglycan assembly», *Eur. J. Biochem.* **248**: 767-774.
- Moses, J.; Oldberg, Å. y Fransson, L.-Å. (1999). «Initiation of galactosaminoglycan biosynthesis. Separate galactosylation and dephosphorylation pathways for phosphoxylosylated decorin protein and exogenous xyloside», *Eur. J. Biochem.* **260**: 879-884.
- Mulloy, B. y Forster, M. J. (2000). «Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate», *Glycobiology* **10**: 1147-1156.
- Murdoch, A. D.; Dodge, G. R.; Cohen, I.; Tuan, R. S. y Iozzo, R. V. (1992). «Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor», *J. Biol. Chem.* **267**: 8544-8557.
- Nadanaka, S.; Kitagawa, H.; Goto, F.; Tamura, J.; Neumann, K. W.; Ogawa, T. y Sugahara, K. (1999). «Involvement of the core protein in the first  $\beta$ -*N*-acetylgalactosamine transfer to the glycosaminoglycan–protein linkage-region tetrasaccharide and in the subsequent polymerization: the critical determining step for chondroitin sulphate biosynthesis», *Biochem. J.* **340**: 353-357.
- Nagase, T.; Ishikawa, K.-i.; Suyama, M.; Kikuno, R.; Hirose, M.; Miyajima, N.; Tanaka, A.; Kotani, H.; Nomura, N. y Ohara, O. (1998). «Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new

- cDNA clones from brain which code for large proteins *in vitro*», *DNA Res.* **5**: 355-364.
- Nakamura, Y.; Haines, N.; Chen, J.; Okajima, T.; Furukawa, K.; Urano, T.; Stanley, P.; Irvine, K. D. y Furukawa, K. (2002). «Identification of a *Drosophila* gene encoding xylosylprotein  $\beta$ 4-galactosyltransferase that is essential for the synthesis of glycosaminoglycans and for morphogenesis», *J. Biol. Chem.* **277**: 46280-46288.
- Nakao, M.; Shichijo, S.; Imaizumi, T.; Inoue, Y.; Matsunaga, K.; Yamada, A.; Kikuchi, M.; Tsuda, N.; Ohta, K.; Takamori, S.; Yamana, H.; Fujita, H. y Itoh, K. (2000). «Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL», *J. Immunol.* **164**: 2565-2574.
- Neote, K.; Bapat, B.; Dumbrille-Ross, A.; Troxel, C.; Schuster, S. M.; Mahuran, D. J. y Gravel, R. A. (1988). «Characterization of the human *HEXB* gene encoding lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase», *Genomics* **3**: 279-286.
- Neufeld, E. F. y Muenzer, J. (1995). «The mucopolysaccharidosis», en *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, eds.), 7ª ed. Nueva York: McGraw-Hill, pp. 2465-2494.
- Nomura, T.; Takizawa, M.; Aoki, J.; Arai, H.; Inoue, K.; Wakisaka, E.; Yoshizuka, N.; Imokawa, G.; Dohmae, N.; Takio, K.; Hattori, M. y Matsuo, N. (1998). «Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: glucosylceramide  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase from rat brain», *J. Biol. Chem.* **273**: 13570-13577.
- Norgard-Sumnicht, K. y Varki, A. (1995). «Endothelial heparan sulfate proteoglycans that bind to L-selectin have glucosamine residues with unsubstituted amino groups», *J. Biol. Chem.* **270**: 12012-12024.
- Oegema, T. R., Jr.; Kraft, E. L.; Jourdan, G. W. y Van Valen, T. R. (1984). «Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma», *J. Biol. Chem.* **259**: 1720-1726.
- Oh, S. P.; Taylor, R. W.; Gerecke, D. R.; Rochelle, J. M.; Seldin, M. F. y Olsen, B. R. (1992). «The mouse  $\alpha$ 1(XII) and human  $\alpha$ 1(XII)-like collagen genes are localized on mouse chromosome 9 and human chromosome 6», *Genomics* **14**: 225-231.
- Oh, S. P.; Warman, M. L.; Seldin, M. F.; Cheng, S.-D.; Knoll, J. H. M.; Timmons, S. y Olsen, B. R. (1994). «Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type

- XVIII collagen and localization of the  $\alpha 1$ (XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21», *Genomics* **19**: 494-499.
- Ohtake, S.; Ito, Y.; Fukuta, M. y Habuchi, O. (2001). «Human *N*-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase cDNA is related to human B Cell Recombination Activating gene-associated gene», *J. Biol. Chem.* **276**: 43894-43900.
- Okajima, T.; Yoshida, K.; Kondo, T. y Furukawa, K. (1999a). «Human homolog of *Caenorhabditis elegans sqv-3* gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans», *J. Biol. Chem.* **274**: 22915-22918.
- Okajima, T.; Fukumoto, S.; Furukawa, K.; Urano, T. y Furukawa, K. (1999b). «Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome. Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene», *J. Biol. Chem.* **274**: 28841-28844.
- Okayama, M.; y Lowther, D. A. (1973). «Effects of *O*-xylosides on the synthesis of chondroitin sulphate protein complexes by cartilage», *Proc. Aust. Biochem. Soc.* **6**: 75
- Okayama, M.; Kimata, K. y Suzuki, S. (1973). «The influence of *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-xyloside on the synthesis of proteochondroitin sulfate by slices of embryonic chick cartilage.», *J. Biochem. (Tokyo)* **74**: 1069-1073.
- O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R. y Folkman, J. (1997). «Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth», *Cell* **88**: 277-285.
- Oshima, A.; Kyle, J. W.; Miller, R. D.; Hoffmann, J. W.; Powell, P. P.; Grubb, J. H.; Sly, W. S.; Tropak, M.; Guise, K. S. y Gravel, R. A. (1987). «Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human  $\beta$ -glucuronidase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 685-689.
- Paine-Saunders, S.; Viviano, B. L. y Saunders, S. (1999). «GPC6, a novel member of the glypican gene family, encodes a product structurally related to GPC4 and is colocalized with *GPC5* on human chromosome 13», *Genomics* **57**: 455-458.

- Pallerla, S. R.; Lawrence, R.; Lewejohann, L.; Pan, Y.; Fischer, T.; Schlomann, U.; Zhang, X.; Esko, J. D. y Grobe, K. (2008). «Altered heparan sulfate structure in mice with deleted *NDST3* gene function», *J. Biol. Chem.* **283**: 16885-16894.
- Parish, C. R.; Freeman, C.; Brown, K. J.; Francis, D. J. y Cowden, W. B. (1999). «Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel *in vitro* assays for angiogenesis and heparanase activity», *Cancer Res.* **59**: 3433-3441.
- Pasek, M.; Boeggeman, E.; Ramakrishnan, B. y Qasba, P. K. (2010). «Galectin-1 as a fusion partner for the production of soluble and folded human  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase-T7 in *E. coli*», *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**: 679-684.
- Paulsen, H. y Brenken, M. (1988). «Synthese von L-alanyl-3-O-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)-L-seryl-glycyl-L-isoleucin direkte glycosidierung von peptiden», *Liebigs Ann. Chem.* 649-654.
- Pavão, M. S. G.; VilelaSilva, A. C.; Mourão, P. A. S. y Nicola, V. (2006). «Biosynthesis of chondroitin sulfate: From the early, precursor discoveries to nowadays, genetics approaches», *Adv. Pharmacol.*, **53**: 117-140.
- Pearson, W. R. y Lipman, D. J. (1988). «Improved tools for biological sequence comparison», *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 2444-2448.
- Périn, J. P.; Bonnet, F.; Maillet, P. y Jollès, P. (1988). «Characterization and N-terminal sequence of human platelet proteoglycan», *Biochem. J.* **255**: 1007-1013.
- Perkins, D. N.; Pappin, D. J. C.; Creasy, D. M. y Cottrell, J. S. (1999). «Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data», *Electrophoresis* **20**: 3551-3567.
- Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. y Perrin, D. R. (1980). *Purification of Laboratory Chemicals*, 2ª ed. Nueva York: Pergamon Press.
- Peters, C.; Schmidt, B.; Rommerskirch, W.; Rupp, K.; Zühlsdorf, M.; Vingron, M.; Meyer, H. E.; Pohlmann, R. y von Figura, K. (1990). «Phylogenetic conservation of arylsulfatases. cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B», *J. Biol. Chem.* **265**: 3374-3381.

- Peti, W. y Page, R. (2007). «Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost», *Protein Expr. Purif.* **51**: 1-10.
- Petitou, M.; Herault, J.-P.; Bernat, A.; Driguez, P.-A.; Duchaussoy, P.; Lormeau, J.-C. y Herbert, J.-M. (1999). «Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects», *Nature* **398**: 417-422.
- Petitou, M.; Imbert, A.; Duchaussoy, P.; Driguez, P. A.; Ceccato, M. L.; Gourvenec, F.; Sizun, P.; Héroult, J. P.; Pérez, S. y Herbert, J. M. (2001). «Experimental proof for the structure of a thrombin-inhibiting heparin molecule», *Chemistry* **7**: 858-873.
- Pheiffer, B. H. y Zimmerman, S. B. (1983). «Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribo-oligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions», *Nucl. Acids Res.* **11**: 7853-7871.
- Pikas, D. S.; Eriksson, I. y Kjellén, L. (2000). «Overexpression of different isoforms of glucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate *N*-sulfation patterns», *Biochemistry* **39**: 4552-4558.
- Plaas, A. H. K.; West, L. A.; Wong-Palms, S. y Nelson, F. R. T. (1998). «Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis. Disease-related alterations at the non-reducing termini of chondroitin and dermatan sulfate», *J. Biol. Chem.* **273**: 12642-12649.
- Pluschke, G.; Vanek, M.; Evans, A.; Dittmar, T.; Schmid, P.; Itin, P.; Filardo, E. J. y Reisfeld, R. A. (1996). «Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 9710-9715.
- Poon, G. M. K. y Gariépy, J. (2007). «Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells», *Biochemical Society Transactions* **035**: 788-793.
- Powell, J. T. y Brew, K. (1976). «Metal ion activation of galactosyltransferase», *J. Biol. Chem.* **251**: 3645-3652.
- Prabhakar, V. y Sasisekharan, R. (2006). «The biosynthesis and catabolism of galactosaminoglycans», *Adv. Pharmacol.* **53**: 69-115.
- Prange, C. K.; Pennacchio, L. A.; Lieuallen, K.; Fan, W. y Lennon, G. G. (1998). «Characterization of the human neurocan gene, *CSPG3*», *Gene* **221**: 199-205.

- Presto, J.; Thuveson, M.; Carlsson, P.; Busse, M.; Wilén, M.; Eriksson, I.; Kusche-Gullberg, M. y Kjellén, L. (2008). «Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 4751-4756.
- Quentin, E.; Gladen, A.; Roden, L. y Kresse, H. (1990). «A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan: Galactosyltransferase I deficiency in fibroblasts from a patient with a progeroid syndrome», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 1342-1346.
- Raman, R.; Sasisekharan, V. y Sasisekharan, R. (2005). «Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions», *Chem. Biol.* **12**: 267-277.
- Rapraeger, A. (1989). «Transforming growth factor (type beta) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia», *J. Cell Biol.* **109**: 2509-2518.
- Rapraeger, A.; Jalkanen, M.; Endo, E.; Koda, J. y Bernfield, M. (1985). «The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans», *J. Biol. Chem.* **260**: 11046-11052.
- Ringvall, M.; Ledin, J.; Holmborn, K.; van Kuppevelt, T.; Ellin, F.; Eriksson, I.; Olofsson, A.-M.; Kjellén, L. y Forsberg, E. (2000). «Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-1», *J. Biol. Chem.* **275**: 25926-25930.
- Rini, J.; Esko, J. D. y Varki, A. (2009). «Glycosyltransferases and glycan-processing enzymes», en *Essentials of glycobiology* (A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart y M. E. Etzler, eds.), 2ª ed. La Jolla, California: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Robertson, D. A.; Freeman, C.; Morris, C. P. y Hopwood, J. J. (1992). «A cDNA clone for human glucosamine-6-sulphatase reveals differences between arylsulphatases and non-arylsulphatases», *Biochem. J.* **288**: 539-544.

- Robinson, H. C. y Lindahl, U. (1981). «Effect of cycloheximide,  $\beta$ -D-xylosides and  $\beta$ -D-galactosides on heparin biosynthesis in mouse mastocytoma», *Biochem. J.* **194**: 575-586.
- Robinson, J. A. y Robinson, H. C. (1981). «Control of chondroitin sulphate biosynthesis.  $\beta$ -D-xylopyranosides as substrates for UDP-galactose:D-xylose transferase from embryonic-chicken cartilage», *Biochem. J.* **194**: 839-846.
- Robinson, H. C.; Telser, A. y Dorfman, A. (1966). «Studies on biosynthesis of the linkage region of chondroitin sulfate-protein complex», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**: 1859-1866.
- Rodríguez S., F. y Gómez T., A. (2003). «Mucopolisacaridosis», *Salud UIS* **35**: 135-144.
- Rohrmann, K.; Niemann, R. y Buddecke, E. (1985). «Two *N*-acetyl-galactosaminyltransferase are involved in the biosynthesis of chondroitin sulfate», *Eur. J. Biochem.* **148**: 463-469.
- Rosenberg, R. D.; Shworak, N. W.; Liu, J.; Schwartz, J. J. y Zhang, L. (1997). «Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated?», *J. Clin. Invest.* **99**: 2062-2070.
- Ruoslahti, E. (1989). «Proteoglycans in cell regulation», *J. Biol. Chem.* **264**: 13369-13372.
- Ruoslahti, E. y Yamaguchi, Y. (1991). «Proteoglycans as modulators of growth factor activities», *Cell* **64**: 867-869.
- Saiki, I.; Murata, J.; Nakajima, M.; Tokura, S. y Azuma, I. (1990). «Inhibition by sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cells», *Cancer Res.* **50**: 3631-3637.
- Sakai, S.; Akiyama, H.; Sato, Y.; Yoshioka, Y.; Linhardt, R. J.; Goda, Y.; Maitani, T. y Toida, T. (2006). «Chondroitin sulfate intake inhibits the IgE-mediated allergic response by down-regulating Th2 responses in mice», *J. Biol. Chem.* **281**: 19872-19880.
- Saksela, O. y Rifkin, D. B. (1990). «Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity», *J. Cell Biol.* **110**: 767-775.

- Salimath, P. V.; Spiro, R. C. y Freeze, H. H. (1995). «Identification of a novel glycosaminoglycan core-like molecule II», *J. Biol. Chem.* **270**: 9164-9168.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (C. Nolan, ed.), 2ª ed. Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Moreno, I.; García-García, J. F.; Bastida, A. y García-Junceda, E. (2004). «Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase catalyzed C–C bond formation from dihydroxyacetone», *ChemComm* **2004**: 1634-1635.
- Sarkar, A. K.; Fritz, T. A.; Taylor, W. H. y Esko, J. D. (1995). «Disaccharide uptake and priming in animal cells: Inhibition of sialyl Lewis X by acetylated Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ -O-naphthalenemethanol», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3323-3327.
- Sarkar, A. K.; Rostand, K. S.; Jain, R. K.; Matta, K. L. y Esko, J. D. (1997). «Fucosylation of disaccharide precursors of sialyl Lewis<sup>X</sup> inhibit selectin-mediated cell adhesion», *J. Biol. Chem.* **272**: 25608-25616.
- Sarkar, A. K.; Brown, J. R. y Esko, J. D. (2000). «Synthesis and glycan priming activity of acetylated disaccharides», *Carbohydrate Res.* **329**: 287-300.
- Sasisekharan, R.; Shriver, Z.; Venkataraman, G. y Narayanasami, U. (2002). «Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer», *Nat. Rev. Cancer* **2**: 521-528.
- Sato, T.; Gotoh, M.; Kiyohara, K.; Akashima, T.; Iwasaki, H.; Kameyama, A.; Mochizuki, H.; Yada, T.; Inaba, N.; Togayachi, A.; Kudo, T.; Asada, M.; Watanabe, H.; Imamura, T.; Kimata, K. y Narimatsu, H. (2003). «Differential roles of two *N*-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate», *J. Biol. Chem.* **278**: 3063-3071.
- Saunders, S. y Bernfield, M. (1988). «Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix», *J. Cell Biol.* **106**: 423-430.



- Schmidt, B.; Selmer, T.; Ingendoh, A. y Figurat, K. v. (1995). «A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency», *Cell* **82**: 271-278.
- Schuchman, E. H.; Jackson, C. E. y Desnick, R. J. (1990). «Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatases A and C», *Genomics* **6**: 149-158.
- Schwartz, N. B. (1976). «Biosynthesis of chondroitin sulfate. Role of phospholipids in the activity of UDP-D-galactose:D-xylose galactosyltransferase», *J. Biol. Chem.* **251**: 285-291.
- Schwartz, N. B. y Rodén, L. (1975). «Biosynthesis of chondroitin sulfate. Solubilization of chondroitin sulfate glycosyltransferases and partial purification of uridine diphosphate-D-galactose:D-xylose galactosyltrans», *J. Biol. Chem.* **250**: 5200-5207.
- Schwartz, N. B.; Galligani, L.; Ho, P.-L. y Dorfman, A. (1974a). «Stimulation of synthesis of free chondroitin sulfate chains by  $\beta$ -D-xylosides in cultured cells», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**: 4047-4051.
- Schwartz, N. B.; Rodén, L. y Dorfman, A. (1974b). «Biosynthesis of chondroitin sulfate: Interaction between xylosyltransferase and galactosyltransferase», *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**: 717-724.
- Scott, H. S.; Anson, D. S.; Orsborn, A. M.; Nelson, P. V.; Clements, P. R.; Morris, C. P. y Hopwood, J. J. (1991). «Human  $\alpha$ -L-iduronidase: cDNA isolation and expression», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 9695-9699.
- Scott, H. S.; Blanch, L.; Guo, X.-H.; Freeman, C.; Orsborn, A.; Baker, E.; Sutherland, G. R.; Morris, C. P. y Hopwood, J. J. (1995). «Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome», *Nat. Genet.* **11**: 465-467.
- Seki, N.; Ohira, M.; Nagase, T.; Ishikawa, K.-i.; Miyajima, N.; Nakajima, D.; Nomura, N. y Ohara, O. (1997). «Characterization of cDNA clones in size-fractionated cDNA libraries from human brain», *DNA Res.* **4**: 345-349.
- Seko, A.; Hara-Kuge, S.; Yonezawa, S.; Nagata, K. y Yamashita, K. (1998). «Identification and characterization of N-acetylglucosamine-6-O-sulfate-specific

- $\beta$ 1,4-galactosyltransferase in human colorectal mucosa», *FEBS Lett.* **440**: 307-310.
- Seko, A.; Dohmae, N.; Takio, K. y Yamashita, K. (2003). « $\beta$ 1,4-Galactosyl-transferase ( $\beta$ 4GalT)-IV is specific for GlcNAc 6-O-sulfate.  $\beta$ 4GalT-IV Acts on keratan sulfate-related glycans and a precursor glycan of 6-sulfosialyl-lewis X», *J. Biol. Chem.* **278**: 9150-9158.
- Seldin, D. C.; Austen, K. F. y Stevens, R. L. (1985). «Purification and characterization of protease-resistant secretory granule proteoglycans containing chondroitin sulfate di-B and heparin-like glycosaminoglycans from rat basophilic leukemia cells», *J. Biol. Chem.* **260**: 11131-11139.
- Senay, C.; Lind, T.; Muguruma, K.; Tone, Y.; Kitagawa, H.; Sugahara, K.; Lidholt, K.; Lindahl, U. y Kusche-Gullberg, M. (2000). «The *EXT1/EXT2* tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis», *EMBO Rep.* **1**: 282-286.
- Sertié, A. L.; Sossi, V.; Camargo, A. M. A.; Zatz, M.; Brahe, C. y Passos-Bueno, M. R. (2000). «Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome)», *Hum. Mol. Genet.* **9**: 2051-2058.
- Shukla, D. y Spear, P. G. (2001). «Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry», *J. Clin. Invest.* **108**: 503-510.
- Shworak, N. W.; Liu, J.; Fritze, L. M. S.; Schwartz, J. J.; Zhang, L.; Logeart, D. y Rosenberg, R. D. (1997). «Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase», *J. Biol. Chem.* **272**: 28008-28019.
- Shworak, N. W.; Liu, J.; Petros, L. M.; Zhang, L.; Kobayashi, M.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A. y Rosenberg, R. D. (1999). «Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase», *J. Biol. Chem.* **274**: 5170-5184.
- Silbert, J. E. (1963). «Incorporation of  $^{14}\text{C}$  and  $^3\text{H}$  from nucleotide sugars into a polysaccharide in the presence of a cell-free preparation from mouse mast cell tumors», *J. Biol. Chem.* **238**: 3542-3546.

- Silbert, J. E. y Reppucci, A. C. (1976). «Biosynthesis of chondroitin sulfate. Independent addition of glucuronic acid and *N*-acetylgalactosamine to oligosaccharides», *J. Biol. Chem.* **251**: 3942-3947.
- Sobue, M.; Habuchi, H.; Ito, K.; Yonekura, H.; Oguri, K.; Sakurai, K.; Kamohara, S.; Ueno, Y.; Noyori, R. y Suzuki, S. (1987). « $\beta$ -D-Xylosides and their analogues as artificial initiators of glycosaminoglycan chain synthesis. Aglycone-related variation in their effectiveness *in vitro* and *in ovo*», *Biochem. J.* **241**: 591-601.
- Sommarin, Y.; Wendel, M.; Shen, Z.; Hellman, U. y Heinegård, D. (1998). «Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix», *J. Biol. Chem.* **273**: 16723-16729.
- Sørensen, H. P. y Mortensen, K. K. (2005). «Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*», *J. Biotechnol.* **115**: 113-128.
- Spooner, E.; Gallagher, J. T.; Krizsa, F. y Dexter, T. M. (1983). «Regulation of haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. IV. Glycosaminoglycan synthesis and the stimulation of haemopoiesis by  $\beta$ -D-xylosides», *J. Cell Biol.* **96**: 510-514.
- Stevens, R. L. y Austen, K. F. (1982). «Effect of *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xyloside on proteoglycan and glycosaminoglycan biosynthesis in rat serosal mast cell cultures», *J. Biol. Chem.* **257**: 253-259.
- Stevens, R. L.; Avraham, S.; Gartner, M. C.; Bruns, G. A.; Austen, K. F. y Weis, J. H. (1988). «Isolation and characterization of a cDNA that encodes the peptide core of the secretory granule proteoglycan of human promyelocytic leukemia HL-60 cells», *J. Biol. Chem.* **263**: 7287-7291.
- Stipp, C. S.; Litwack, E. D. y Lander, A. D. (1994). «Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation», *J. Cell Biol.* **124**: 149-160.
- Sugahara, K. y Kitagawa, H. (2000). «Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans», *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 518-527.

- Sugahara, K. y Kitagawa, H. (2002). «Heparin and heparan sulfate biosynthesis», *IUBMB Life* **54**: 163-175.
- Sugahara, K.; Yamashina, I.; De Waard, P.; Van Halbeek, H. y Vliegenthart, J. F. (1988). «Structural studies on sulfated glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 4-sulfate proteoglycans of swarm rat chondrosarcoma. Demonstration of the structure Gal(4-O-sulfate) $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-O-Ser», *J. Biol. Chem.* **263**: 10168-10174.
- Sugahara, K.; Ohi, Y.; Harada, T.; de Waard, P. y Vliegenthart, J. F. (1992a). «Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. I. Six compounds containing 0 or 1 sulfate and/or phosphate residues», *J. Biol. Chem.* **267**: 6027-6035.
- Sugahara, K.; Yamada, S.; Yoshida, K.; de Waard, P. y Vliegenthart, J. F. (1992b). «A novel sulfated structure in the carbohydrate-protein linkage region isolated from porcine intestinal heparin», *J. Biol. Chem.* **267**: 1528-1533.
- Sugahara, K.; Ohkita, Y.; Shibata, Y.; Yoshida, K. y Ikegami, A. (1995). «Structural studies on the hexasaccharide alditols isolated from the carbohydrate-protein linkage region of dermatan sulfate proteoglycans of bovine aorta», *J. Biol. Chem.* **270**: 7204-7212.
- Sugumaran, G. y Silbert, J. E. (1991). «Subfractionation of chick embryo epiphyseal cartilage Golgi. Localization of enzymes involved in the synthesis of the polysaccharide portion of proteochondroitin sulfate», *J. Biol. Chem.* **266**: 9565-9569.
- Takagaki, K.; Nakamura, T.; Takeda, Y.; Daidouji, K. y Endo, M. (1992). «A new endo- $\beta$ -galactosidase acting on the Gal $\beta$ 1-3Gal linkage of the proteoglycan linkage region», *J. Biol. Chem.* **267**: 18558-18563.
- Takahashi, S.; Kuzuhara, H. y Nakajima, M. (2001). «Design and synthesis of a heparanase inhibitor with pseudodisaccharide structure», *Tetrahedron* **57**: 6915-6926.
- Takemae, H.; Ueda, R.; Okubo, R.; Nakato, H.; Izumi, S.; Saigo, K. y Nishihara, S. (2003). «Proteoglycan UDP-galactose: $\beta$ -xylose  $\beta$ 1,4-galactosyl-transferase I is

- essential for viability in *Drosophila melanogaster*», *J. Biol. Chem.* **278**: 15571-15578.
- Takeuchi, Y.; Sakaguchi, K.; Yanagishita, M.; Aurbach, G. D. y Hascall, V. C. (1990). «Extracellular calcium regulates distribution and transport of heparan sulfate proteoglycans in a rat parathyroid cell line», *J. Biol. Chem.* **265**: 13661-13668.
- Talhaoui, I.; Bui, C.; Oriol, R.; Mulliert, G.; Gulberti, S.; Netter, P.; Coughtrie, M. W. H.; Ouzzine, M. y Fournel-Gigleux, S. (2010). «Identification of key functional residues in the active site of human  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7: A major enzyme in the glycosaminoglycan synthesis pathway», *J. Biol. Chem.* **285**: 37342-37358.
- Tasheva, E. S.; Funderburgh, J. L.; Funderburgh, M. L.; Corpuz, L. M. y Conrad, G. W. (1999). «Structure and sequence of the gene encoding human keratocan», *DNA Seq.* **10**: 67-74.
- Taylor, J. A.; Gibson, G. J.; Brooks, D. A. y Hopwood, J. J. (1991). « $\alpha$ -L-Iduronidase in normal and mucopolysaccharidosis-type-I human skin fibroblasts», *Biochem. J.* **274**: 263-268.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). «CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice», *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Tomatsu, S.; Fukuda, S.; Masue, M.; Sukegawa, K.; Fukao, T.; Yamagishi, A.; Hori, T.; Iwata, H.; Ogawa, T.; Nakashima, Y.; Hanyu, Y.; Hashimoto, T.; Titani, K.; Oyama, R.; Suzuki, M.; Yagi, K.; Hayashi, Y. y Orii, T. (1991). «Morquio disease: Isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase», *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 677-683.
- Tone, Y.; Pedersen, L. C.; Yamamoto, T.; Izumikawa, T.; Kitagawa, H.; Nishihara, J.; Tamura, J.-i.; Negishi, M. y Sugahara, K. (2008). «2-O-phosphorylation of xylose and 6-O-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis», *J. Biol. Chem.* **283**: 16801–16807.

- Tsen, G.; Halfter, W.; Kröger, S. y Cole, G. J. (1995). «Agrin is a heparan sulfate proteoglycan», *J. Biol. Chem.* **270**: 3392-3399.
- Ueno, M.; Yamada, S.; Zako, M.; Bernfield, M. y Sugahara, K. (2001). «Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence», *J. Biol. Chem.* **276**: 29134-29140.
- Uhlin-Hansen, L. y Yanagishita, M. (1993). «Differential effect of brefeldin A on the biosynthesis of heparan sulfate and chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans in rat ovarian granulosa cells in culture», *J. Biol. Chem.* **268**: 17370-17376.
- Uyama, T.; Kitagawa, H.; Tamura, J.-i. y Sugahara, K. (2002). «Molecular cloning and expression of human chondroitin *N*-acetylgalactosaminyl-transferase. The key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate», *J. Biol. Chem.* **277**: 8841-8846.
- Uyama, T.; Kitagawa, H.; Tanaka, J.; Tamura, J.-i.; Ogawa, T. y Sugahara, K. (2003). «Molecular cloning and expression of a second chondroitin *N*-acetylgalactosaminyltransferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate», *J. Biol. Chem.* **278**: 3072-3078.
- Uyama, T.; Ishida, M.; Izumikawa, T.; Trybala, E.; Tufaro, F.; Bergström, T.; Sugahara, K. y Kitagawa, H. (2006). «Chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1 regulates E disaccharide expression of chondroitin sulfate required for herpes simplex virus infectivity», *J. Biol. Chem.* **281**: 38668-38674.
- Vadaie, N.; Hulinsky, R. S. y Jarvis, D. L. (2002). «Identification and characterization of a *Drosophila melanogaster* ortholog of human  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase VII», *Glycobiology* **12**: 589-597.
- Van den Nieuwenhof, I. M.; Schiphorst, W. E. C. M.; Van Die, I. y Van den Eijnden, D. H. (1999). «Bovine mammary gland UDP-GalNAc:GlcNAc $\beta$ -R  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase is glycoprotein hormone nonspecific and shows interaction with  $\alpha$ -lactalbumin», *Glycobiology* **9**: 115-123.

- Varki, A. y Lowe, J. B. (2009). «Biological roles of glycans», en *Essentials of glycobiology* (A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart y M. E. Etzler, eds.), 2ª ed. La Jolla, California: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Veugelers, M.; Vermeesch, J.; Reekmans, G.; Steinfeld, R.; Marynen, P. y David, G. (1997). «Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of humanGPC5, a new member of the glypican gene family», *Genomics* **40**: 24-30.
- Veugelers, M.; De Cat, B.; Ceulemans, H.; Bruystens, A.-M.; Coomans, C.; Dürr, J.; Vermeesch, J.; Marynen, P. y David, G. (1999). «Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans», *J. Biol. Chem.* **274**: 26968-26977.
- de Waard, P.; Vliegthart, J. F.; Harada, T. y Sugahara, K. (1992). «Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. II. Seven compounds containing 2 or 3 sulfate residues», *J. Biol. Chem.* **267**: 6036-6043.
- Wassenhove-McCarthy, D. J. y McCarthy, K. J. (1999). «Molecular characterization of a novel basement membrane-associated proteoglycan, leprecan», *J. Biol. Chem.* **274**: 25004-25017.
- Watanabe, K.; Yamada, H. y Yamaguchi, Y. (1995). «K-glypican: a novel GPI-anchored heparan sulfate proteoglycan that is highly expressed in developing brain and kidney», *J. Cell Biol.* **130**: 1207-1218.
- Watanabe, N.; Araki, W.; Chui, D.-H.; Makifuchi, T.; Ihara, Y. y Tabira, T. (2004). «Glypican-1 as an A $\beta$  binding HSPG in the human brain: its localization in DIG domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease», *FASEB J.* **18**: 1013-1015.
- Weber, B.; Blanch, L.; Clements, P. R.; Scott, H. S. y Hopwood, J. J. (1996). «Cloning and expression of the gene involved in Sanfilippo B syndrome (mucopolysaccharidosis III B)», *Hum. Mol. Genet.* **5**: 771-777.
- Wei, G.; Bai, X.; Sarkar, A. K. y Esko, J. D. (1999). «Formation of HNK-1 determinants and the glycosaminoglycan tetrasaccharide linkage region by

- UDP-GlcUA:galactose  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferases», *J. Biol. Chem.* **274**: 7857-7864.
- Whitelock, J. M. y Iozzo, R. V. (2005). «Heparan sulfate: A complex polymer charged with biological activity», *Chem. Rev.* **105**: 2745-2764.
- Wilson, P. J.; Morris, C. P.; Anson, D. S.; Occhiodoro, T.; Bielicki, J.; Clements, P. R. y Hopwood, J. J. (1990). «Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 8531-8535.
- Wilson, I. B. H. (2004). «The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase», *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 794-809.
- Winchester, B. (2005). «Lysosomal metabolism of glycoproteins», *Glycobiology* **15**: 1R-15.
- Wong, C.-H. y Whitesides, G. M. (1994). «Synthesis of glycoside bonds», en *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry* (J. E. Baldwin y P. D. Magnus eds.), 1ª ed. Oxford: Pergamon Press.
- Xia, G.; Chen, J.; Tiwari, V.; Ju, W.; Li, J.-P.; Malmström, A.; Shukla, D. y Liu, J. (2002). «Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1», *J. Biol. Chem.* **277**: 37912-37919.
- Xu, D.; Tiwari, V.; Xia, G.; Clement, C.; Shukla, D. y Liu, J. (2005). «Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1», *Biochem. J.* **385**: 451-459.
- Yada, T.; Sato, T.; Kaseyama, H.; Gotoh, M.; Iwasaki, H.; Kikuchi, N.; Kwon, Y.-D.; Togayachi, A.; Kudo, T.; Watanabe, H.; Narimatsu, H. y Kimata, K. (2003a). «Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization», *J. Biol. Chem.* **278**: 39711-39725.
- Yada, T.; Gotoh, M.; Sato, T.; Shionyu, M.; Go, M.; Kaseyama, H.; Iwasaki, H.; Kikuchi, N.; Kwon, Y.-D.; Togayachi, A.; Kudo, T.; Watanabe, H.; Narimatsu, H. y Kimata, K. (2003b). «Chondroitin sulfate synthase-2. Molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin



- sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities», *J. Biol. Chem.* **278**: 30235-30247.
- Yamada, H.; Watanabe, K.; Shimonaka, M. y Yamaguchi, Y. (1994). «Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family», *J. Biol. Chem.* **269**: 10119-10126.
- Yanagishita, M. (1992). «Glycosylphosphatidylinositol-anchored and core protein-intercalated heparan sulfate proteoglycans in rat ovarian granulosa cells have distinct secretory, endocytotic, and intracellular degradative pathways», *J. Biol. Chem.* **267**: 9505-9511.
- Yanagishita, M. y Hascall, V. C. (1992). «Cell surface heparan sulfate proteoglycans», *J. Biol. Chem.* **267**: 9451-9454.
- Yin, J.; Li, G.; Ren, X. y Herrler, G. (2007). «Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes», *J. Biotechnol.* **127**: 335-347.
- Yurt, R. W.; Leid, R. W., Jr.; Austen, K. F. y Silbert, J. E. (1977). «Native heparin from rat peritoneal mast cells», *J. Biol. Chem.* **252**: 518-521.
- Zhang, L. y Esko, J. D. (1994). «Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan», *J. Biol. Chem.* **269**: 19295-19299.
- Zhang, L.; David, G. y Esko, J. D. (1995). «Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan-sulfate assembly in proteoglycans.», *J. Biol. Chem.* **270**: 27127-27135.
- Zhang, L.; Beeler, D. L.; Lawrence, R.; Lech, M.; Liu, J.; Davis, J. C.; Shriver, Z.; Sasisekharan, R. y Rosenberg, R. D. (2001). «6-O-sulfotransferase-1 represents a critical enzyme in the anticoagulant heparan sulfate biosynthetic pathway», *J. Biol. Chem.* **276**: 42311-42321.
- Zhao, H. G.; Li, H. H.; Bach, G.; Schmidtchen, A. y Neufeld, E. F. (1996). «The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 6101-6105.
- Zhou, D.; Dinter, A.; Gutiérrez Gallego, R.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G.; Berger, E. G. y Hennet, T. (1999). «A  $\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyl-transferase with poly-N-acetyllactosamine synthase activity is structurally related to  $\beta$ -1,3-galactosyltransferases», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 406-411.

Zimmermann, D. R. y Ruoslahti, E. (1989). «Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican», *EMBO J.* **8**: 2975-2981.

**Anexo**  
**(*Mol. BioSyst.* 7: 1312-1321)**



Synthesis and evaluation of xylopyranoside derivatives as “decoy acceptors” of human  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 7†Juan Francisco García-García,<sup>a</sup> Guillermo Corrales,<sup>a</sup> Josefina Casas,<sup>b</sup> Alfonso Fernández-Mayoralas<sup>\*a</sup> and Eduardo García-Junceda<sup>\*a</sup>

Received 24th September 2010, Accepted 24th January 2011

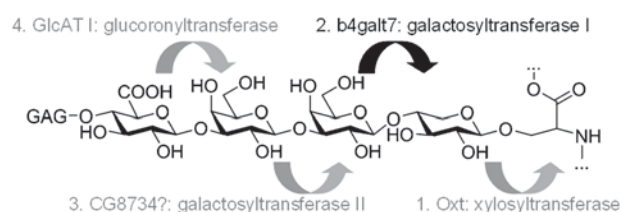
DOI: 10.1039/c0mb00206b

Proteoglycans (PGs), including heparan sulfate forms, are important regulators of tumor progression. In the PGs biosynthetic process, the core protein is synthesized on a ribosomal template and the sugar chains are assembled post-translationally, one sugar at a time, starting with the linkage of xylose to a serine residue of the core protein and followed by galactosidation of the xylosylprotein. Hydrophobic xylopyranosides have been previously shown to prime heparan sulfate synthesis, a property that was required to cause growth inhibition of tumor cells. To know if the antiproliferative activity of synthetic xylopyranosides is related to their ability to act as “decoy acceptors” of xylosylprotein 4- $\beta$ -galactosyltransferase, we have heterologously expressed the catalytic domain of the human  $\beta$ -1,4-GalT 7 and studied the ability of a variety of synthetic xylopyranoside derivatives to act as substrates or inhibitors of the recombinant enzyme.

## Introduction

Proteoglycans are highly active and complex biomolecules involved in a wide range of physiological and pathological processes through their interactions with several proteins.<sup>1</sup> They are composed of a core protein usually attached to the cell membrane and one or more glycosaminoglycan (GAG) chains attached at specific Ser residues of the core protein. GAGs are linear polysaccharides composed of alternating *N*-acetylated or *N*-sulfated glucosamine units and either glucuronic or iduronic acid. The GAG chains are linked to the protein core by a tetrasaccharide linker that is shared by all proteoglycans. The assembly of this tetrasaccharide is carried out in the Golgi and began with the transfer of a xylose residue to a specific Ser of the protein chain, catalysed by a xylosyltransferase and is continued by the sequential action of specific glycosyltransferases (Scheme 1).<sup>2</sup>

It is known for more than 30 years that  $\beta$ -D-xylopyranoside with hydrophobic aglycones can act as primers for GAG



Scheme 1 Biosynthesis of the proteoglycan tetrasaccharide primer.

biosynthesis and thereby inhibit the assembly of glycosaminoglycan chains on endogenous proteoglycan core proteins.<sup>3</sup> Okayama *et al.*<sup>3a</sup> named these compounds, that being substrates for a particular enzyme are able to inhibit a metabolic pathway, “decoy acceptors” to distinguish them from inhibitors, which are compounds that block the enzyme without being modified by it. This concept has been also applied to suppress the synthesis of the mucin chain in mucoproteins,<sup>4</sup> to down-regulate the expression of sLex ligands<sup>5</sup> or to restore the streptomycin antibiotic activity against aminoglycoside resistant *Escherichia coli* strains.<sup>6</sup>

Synthesis of GAG chain can be initiated by  $\beta$ -D-xylosides by joining the intracellular enzyme machinery at the second glycosyltransferase step (galactosyltransferase I, Scheme 1) and their ability to prime the assembly of GAG chains and their composition depends on the structure of the aglycone moiety.<sup>7</sup> In most cases, xylosides prime chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) efficiently and heparan sulfate (HS) only weakly.<sup>7b</sup> Xylosides containing polycyclic structures, such as naphthol-derivatives, will prime a mixture of both HS and CS/DS chains.<sup>7b,8</sup> The xyloside-primed GAG chains

<sup>a</sup> Departamento de Química Bioorgánica, Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid 28006, Spain.  
E-mail: eduardo.junceda@iqog.csic.es, mayoralas@iqog.csic.es;  
Fax: +34 915 644 853; Tel: +34 915 622 900

<sup>b</sup> Research Unit on BioActive Molecules, Departamento de Química Orgánica Biológica, Instituto de Química Avanzada de Cataluña, CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain.  
E-mail: jcbqob@iiqab.csic.es; Fax: +34 932 045 904;  
Tel: +34 934 006 115

† Electronic supplementary information (ESI) available: Cloning and purification of enzyme  $\beta$ -1,4-GalT 7, experimental details and Table S1 containing data of antiproliferative activity of xylopyranoside derivatives **4**, **7**, **8**, **9**, **13**, **14** and peracetates **24** and **25**. See DOI: 10.1039/c0mb00206b

can be retained inside the cells but in general are secreted into the medium in a nearly quantitative way, since the small hydrophobic aglycones are not able to tie the chains to cell membranes.

Therefore, xylopyranoside derivatives may be used to interfere with the proteoglycans biosynthesis and thus modulate various cellular activities, such as cell growth. In this sense, Esko and co-workers have shown that GAG-priming xylosides render tumor cells more sensitive to the cytostatic effects of  $\alpha$ -difluoromethylornithine (DFMO), an inhibitor of *de novo* polyamine biosynthesis.<sup>9</sup> Mani and co-workers, in a series of elegant papers,<sup>8,10</sup> have shown that 2-(6-hydroxy-naphthyl)  $\beta$ -D-xylopyranoside (**14**) selectively inhibits the proliferation of transformed or tumor-derived cells both *in vitro* and *in vivo*. Also, treatment with this xyloside reduced the average tumor load by 70–97% in a SCID mice model.

The ability of the xylosides to prime the assembly of GAG chains—and hence their potential activity as antitumor agents—must be related to their ability to act as acceptors of the xylosylprotein 4- $\beta$ -galactosyltransferase ( $\beta$ -1,4-GalT 7 in Scheme 1). Herein, we describe the heterologous expression in *E. coli* of a truncated form of the human  $\beta$ -1,4-GalT 7 and its biochemical characterization. Also, we report the synthesis of a family of xylopyranoside derivatives and the study of their ability to act as substrates or inhibitors of the recombinant  $\beta$ -1,4-GalT 7.

## Results and discussion

### Heterologous expression of a soluble form of human $\beta$ -1,4-GalT 7 and its biochemical characterization

Galactosyltransferase I or  $\beta$ -1,4-GalT 7 (UDP-galactose:O- $\beta$ -D-xylosylprotein 4- $\beta$ -D-galactosyltransferase, EC 2.4.1.133) is involved in the synthesis of the common glycosaminoglycan-protein linkage region. In particular, it catalyzes the first galactosylation step of the xylose bound to the core protein of proteoglycans (Scheme 1). The gene codifying for this enzyme in humans was identified almost simultaneously by Almeida *et al.*<sup>11</sup> and Okajima *et al.*<sup>12</sup> Human  $\beta$ -1,4-GalT 7 is a Type II membrane protein. These proteins share a common structure comprised of a short N-terminal cytoplasmic tail, a membrane spanning region followed by a luminal stem region and a large C-terminal catalytic domain (Fig. 1).<sup>13</sup>

To facilitate general studies on enzymes, large-scale production systems are needed.<sup>14</sup> Prokaryotic expression systems, and in particular *E. coli*, are the most attractive ones for large scale production of recombinant proteins because of their ability to grow rapidly and at high density on inexpensive substrates.<sup>15</sup> However, when a heterologous protein is over-expressed in *E. coli* misfolding and aggregation happen frequently, driving the recombinant protein into inactive aggregates known as inclusion bodies. These limitations are especially important for eukaryotic proteins that require post-translational modifications such as glycosylation. A myriad of strategies have been developed in the last several years to increase the yield of soluble mammalian recombinant protein using *E. coli* as an expression host. Some of these strategies are: reduction of the recombinant protein production rate;<sup>16</sup>

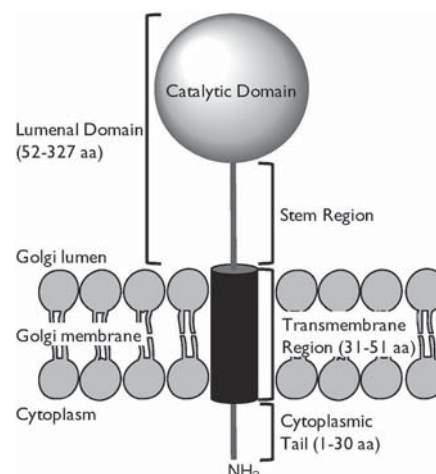


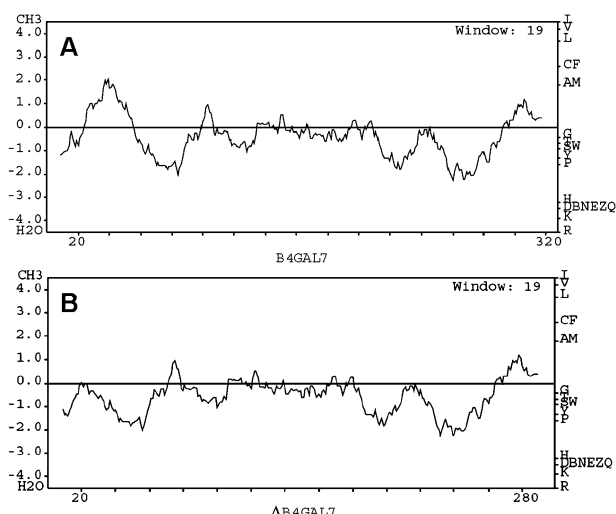
Fig. 1 Schematic representation of the human  $\beta$ -1,4-GalT 7 topology.

increasing the cellular levels of molecular chaperones;<sup>17</sup> to fuse the recombinant protein to a soluble fusion tag.<sup>18</sup>

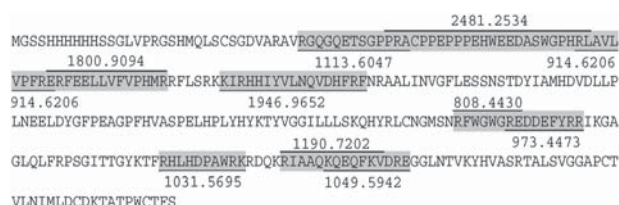
Using the latter approach, soluble human  $\beta$ -1,4-GalT 7 has been lately expressed in *E. coli*. Lattard and co-workers expressed a truncated form of the enzyme—lacking the first 81 N-terminal amino acids that include the transmembrane and stem regions—fused with the MBP.<sup>19</sup> On the other hand, Qasba and co-workers expressed the human  $\beta$ -1,4-GalT 7 using as fusion partner the human lectin galectin-1.<sup>20</sup> Very recently, Fournel-Gigleux and co-workers have reported the production of the wild-type  $\beta$ -1,4-GalT 7 and some mutants as truncated fusion proteins (lacking the 60 N-terminal amino acids) linked to GST.<sup>30</sup> These authors also have identified two functional regions critical for the organization of UDP-Gal binding. They also demonstrated the central role of Trp224 in governing interactions with both donor and acceptor substrates.

Several examples in the literature reported the soluble expression of the catalytic domain of glycosyltransferases (GT's).<sup>21</sup> Since the human  $\beta$ -1,4-GalT 7 presents only one potential glycosylation site (Asn154), we decided to express the soluble domain of the protein (Fig. 1) in *E. coli* fused to a six His tag to allow its purification by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). We took advantage of the presence of a unique recognition sequence for the endonuclease *Pst*I that allowed to cut between the aminoacids 49–50 of the enzyme and therefore to remove the transmembrane region and the cytoplasmic tail (for experimental details see ESI†).

Comparison of the graphic plots of Kyte–Doolittle hydrophobicity profiles of wild-type and truncated  $\beta$ -1,4-GalT 7 clearly shows that the transmembrane region had been eliminated (Fig. 2). Peptide mass fingerprinting from the SDS-PAGE band verified that the purified protein had the  $\beta$ -1,4-GalT 7 expected features. Nine peptides covering the major part of the amino acid sequence of the soluble domain were identified (Fig. 3). Almost all the predicted tryptic peptides with molecular masses falling in the analyzed  $m/z$  range were found in the peptide mass fingerprint of the  $\beta$ -1,4-GalT 7 soluble domain. Other unassigned peptides were identified using the FindMod tool.<sup>22</sup> Thus, the peptide with  $m/z = 1800.9094$  (dark gray in Fig. 3) was assigned to the



**Fig. 2** Kyte–Doolittle hydropathicity profile of (A) wild-type human  $\beta$ -1,4-GalT 7 and (B) the truncated form of the enzyme.



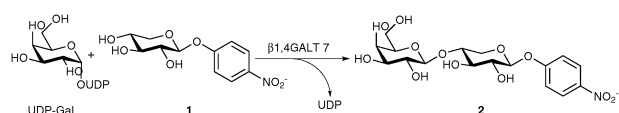
**Fig. 3** Peptide mass fingerprint of  $\beta$ -1,4-GalT 7 soluble domain incorporating a N-t His tag. The sequences of the identified peptides are shaded and underlined. Molecular mass of each peptide is indicated in Da.

peptide ERFEELLVFVPHMR included in the sequence of the soluble domain.

The activity of the  $\beta$ -1,4-GalT 7 soluble domain was initially assayed using UDP-Gal as the glycosyl donor and *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside (*p*-NO<sub>2</sub>Ph- $\beta$ -D-Xyl; **1**) as the acceptor (Scheme 2). The time course of the reaction was followed by HPLC. The formation of a new peak with a retention time of 10.2 min was observed. This peak showed a  $m/z$  of 432.1 ( $M - H^+$ ), matching the mass of disaccharide **2**.

The recombinant  $\beta$ -1,4-GalT 7 soluble domain showed a Michaelis–Menten kinetic for *p*-NO<sub>2</sub>Ph- $\beta$ -D-xyl. The apparent  $K_M$  value (at saturating concentration of UDP-Gal) was 0.59 mM with an apparent  $k_{cat}$  of 49.8 s<sup>−1</sup> (Table 1).

The behavior observed towards UDP-Gal was more complex since the soluble domain of the  $\beta$ -1,4-GalT 7 showed excess-substrate inhibition from a donor concentration of 1.25 mM (Fig. 4). This excess-substrate inhibition has been also described by Qasba and co-workers for the galectin1- $\beta$ 4GalT7 fusion protein.<sup>20</sup> The calculated  $k_{is}$  for UDP-Gal was 21.1 mM.



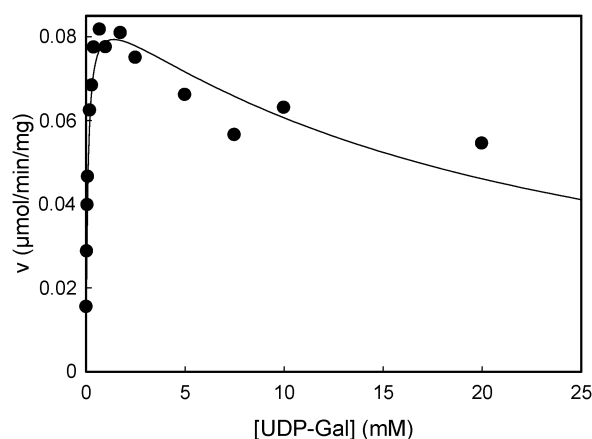
**Scheme 2**

**Table 1** Summary of the kinetic constants of the recombinant  $\beta$ -1,4-GalT 7 soluble domain

Substrate	$K_M$ /mM	$k_{cat}$ /s <sup>−1</sup>	$k_{cat}/K_M$ s <sup>−1</sup> M <sup>−1</sup>	$k_{is}$ /mM
<i>p</i> -NO <sub>2</sub> Ph- $\beta$ -D-Xyl ( <b>1</b> ) <sup>a</sup>	0.59	49.8	$8.5 \times 10^4$	—
UDP-Gal <sup>b</sup>	0.1	51.4	$55.6 \times 10^4$	21.1

<sup>a</sup> Kinetic parameters obtained from fits to Michaelis–Menten eqn (1).

<sup>b</sup> Kinetic parameters obtained from fits to eqn (2).



**Fig. 4** Michaelis–Menten representation of the  $\beta$ -1,4-GalT 7 soluble domain activity ( $v$ ) as a function of the UDP-Gal concentration, where the inhibition by substrate excess can be observed.

The  $K_M$  value obtained towards UDP-Gal for the soluble domain of the  $\beta$ -1,4-GalT 7, was comparable, although somewhat lower, to the data reported by Lattard and co-workers<sup>19</sup> for the MBP- $\beta$ 4GalT7 fusion protein (0.23 mM) and by Fournel-Gigleux and co-workers<sup>30</sup> for the GST- $\beta$ -1,4-GalT7 (0.28 mM). However, the  $k_{cat}$  value obtained for the soluble domain was about 30-fold higher than that reported by Lattard and co-workers (Fournel-Gigleux *et al.* used 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylopyranoside as acceptor). These differences observed in the  $K_M$  and the  $k_{cat}$  values could be due to an entropy loss of the active site in the fused MBP- $\beta$ 4GalT7 enzyme. Besides, it is necessary to have in mind that the reported data are apparent constants and it cannot be discarded that the differences observed may be due to the different conditions in which these values have been calculated in both works.

### Synthesis of xylopyranoside derivatives

In Chart 1 the different xylose derivatives **3–14** used for the enzymatic study are shown.

A group of compounds containing a common *N*-(*O*-xylopyranosyl)-hydroxylpropylamide moiety with a variable acyl group (compounds **8–12**) was selected to compare the effect of aliphatic or aromatic groups on the activity of the xyloside as decoy acceptor. Acyl groups containing a carboxyl (**10** and **12**) were also included, since it is known that acidic amino acid residues are usually present near the glycosylation site of both HS and CS/DS.<sup>23</sup>

Compounds **5–7** were obtained as previously described by one of us<sup>24</sup> and compound **14** was obtained following the procedure described by Mani *et al.*<sup>8</sup>

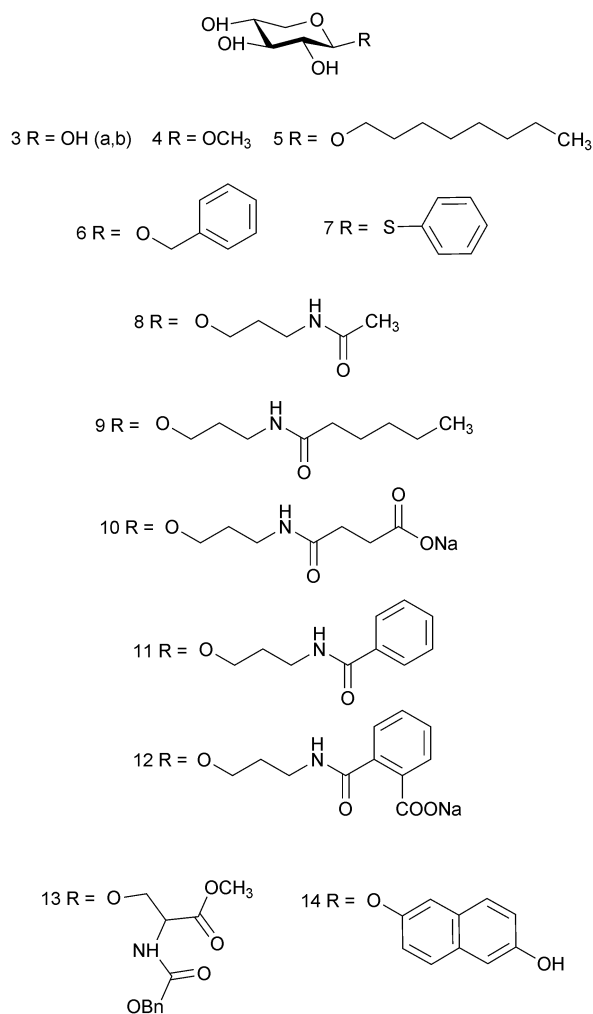


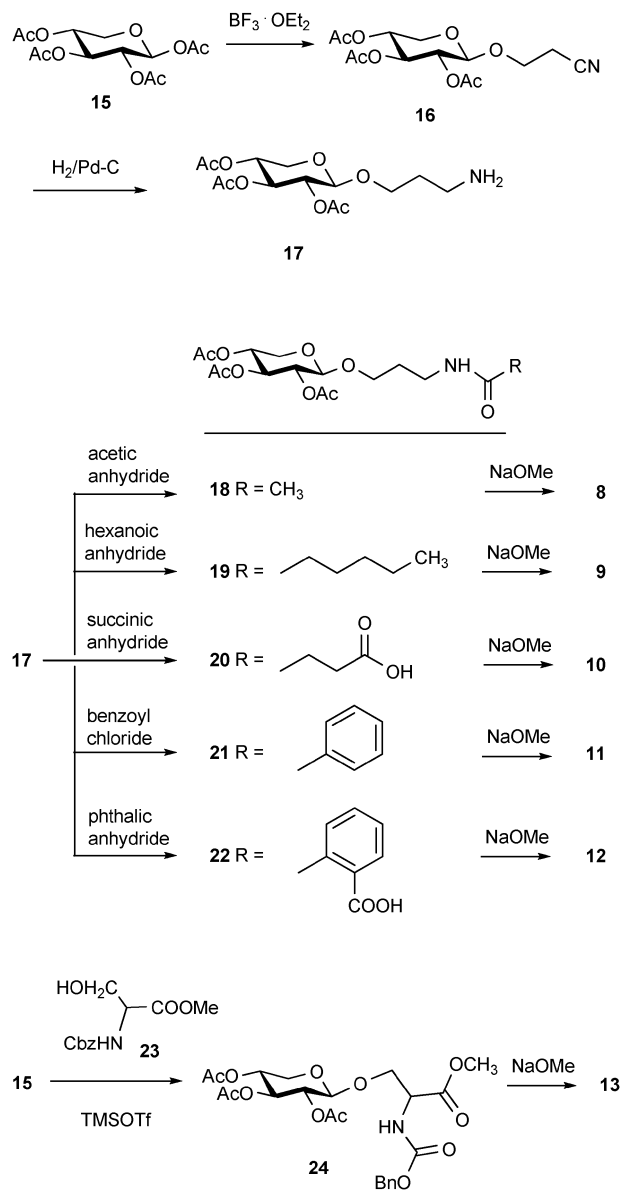
Chart 1

The synthesis of amides **8–12** was carried out from a common amine intermediate **17**, which was prepared by glycosidation of xylose tetracetate **15** with 3-hydroxypropionitrile followed by hydrogenation of the nitrile group (Scheme 3).

The reaction of **17** with different acylating reagents gave the corresponding amides **18–22** that were subsequently *O*-deacetylated to afford the targets **8–12**. For the synthesis of glycosyl amino acid **13**, xylose peracetate **15** was reacted with protected L-serine derivative **23** in the presence of TMSOTf, to give stereoselectively the  $\beta$ -glycoside **24** in 75% yield (Scheme 3). Subsequent *O*-deacetylation under mild conditions (KCN/MeOH) furnished **13**.

#### Study of the activity of the xylopyranoside derivatives as decoy acceptors of the recombinant soluble domain of the $\beta$ -1,4-GalT 7

The activity as decoy acceptors of the xylopyranoside derivatives was evaluated by comparison of the catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) showed by the recombinant soluble domain of the  $\beta$ -1,4-GalT 7 towards the different xylosides. Since these xylopyranosides mimic the natural acceptor of the  $\beta$ -1,4-GalT 7, they may compete with it and act also as inhibitors of the enzyme. Therefore, another way to evaluate



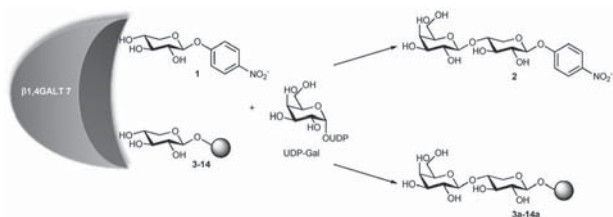
Scheme 3

the activity of these compounds as decoy acceptors is to measure their ability to inhibit the formation of the natural reaction product. In our case, we evaluated their ability to inhibit (IC<sub>50</sub>) the formation of **2** by the recombinant enzyme (Fig. 5).

The 2-(6-hydroxynaphthyl)  $\beta$ -D-xylopyranoside (**14**) was included in this study for comparative purposes. The results are summarized in Table 2.

As it has been commented above, Mani and co-workers<sup>8</sup> have demonstrated that compound **14** is able to prime glycosaminoglycan synthesis. As expected, **14** was the substrate of the recombinant enzyme. However, like in the case of the UDP-Gal, **14** showed a strong inhibition by substrate excess ( $k_{\text{is}} = 0.38 \text{ mM}$ ). Therefore, the kinetic parameters were obtained from fit data to eqn (2) (see Experimental). The calculated catalytic efficiency was slightly lower than with acceptor **1**. This difference can be attributed to the lower  $k_{\text{cat}}$  showed by **14**. According to the proposed hypothesis, since





**Fig. 5** If the xylopyranoside derivative is a good substrate for the enzyme, then it can act as a decoy acceptor sequestering the enzyme activity and thus preventing the formation of the natural product. In this study, we have evaluated the ability of the xylosides **3–14** to prevent the formation of **2**.

**Table 2** Evaluation of xylosides **3–14** as decoy acceptors of the recombinant human  $\beta$ -1,4-GalT 7<sup>a</sup>

	$K_M/\text{mM}$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_M/\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\text{mM}$
<b>14</b> <sup>b,c</sup>	0.58	30.2	52.1	0.30
<b>3</b>	N.D	N.D	N.D	> 20
<b>4</b>	N.D	N.D	N.D	> 20
<b>5</b>	0.37	60.7	164.0	0.95
<b>6</b>	0.28	57.6	205.7	1.26
<b>7</b>	0.74	87.4	118.1	0.52
<b>8</b>	0.75	41.0	54.7	3.69
<b>9</b>	0.75	64.3	85.7	2.46
<b>10</b>	0.56	47.2	84.3	3.96
<b>11</b>	0.53	78.7	148.5	1.04
<b>12</b>	0.40	106.3	265.7	0.61
<b>13</b> <sup>c</sup>	0.53	152.0	286.8	2.39

<sup>a</sup> All xylopyranosides have  $\beta$  configuration except for compound **3**, which was an  $\alpha$  and  $\beta$  anomeric mixture. <sup>b</sup> Kinetic parameters obtained from fits to eqn (2). <sup>c</sup> Reaction contains 10% of DMSO.

xylopyranoside **14** is a good substrate for the enzyme, it can act as a decoy acceptor sequestering the enzyme activity and thus preventing the formation of **2**. In fact, **14** was able to inhibit the formation of **2** with an  $\text{IC}_{50}$  of 0.3 mM (Table 2). Although the  $\text{IC}_{50}$  value does not indicate the type of inhibition promoted by **14**, it seems clear that in this context the inhibition must be competitive. To substantiate this fact, we calculated the  $k_i$  for **14**. As expected, the data fit to eqn (3) that describes the competitive inhibition. The calculated  $k_i$  value (0.14 mM) was significantly lower than the  $\text{IC}_{50}$  value.

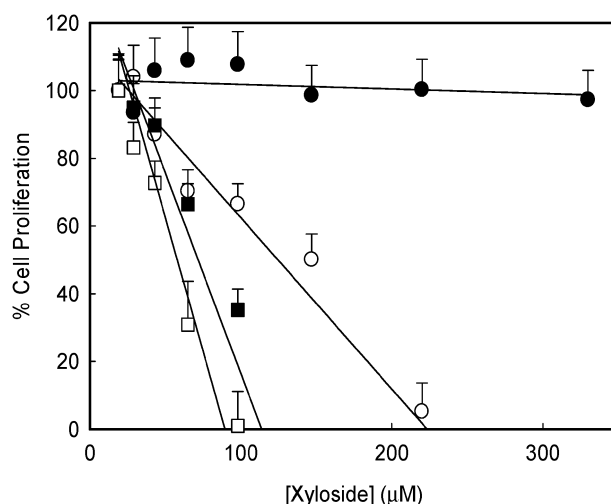
With respect to xylopyranosides **3–13**, only those lacking hydrophobic aglycone (compounds **3** and **4**) showed no activity with the soluble domain of the  $\beta$ -1,4-GalT 7. Their kinetic parameters were not calculated since the transglycosylation rates were in both cases lower than the 5% of the reaction rate of the recombinant enzyme with *p*-NO<sub>2</sub>Ph- $\beta$ -D-Xyl (**1**) as acceptor. Moreover, they showed no inhibition even at concentration as high as 20 mM. All other xylosides were both substrates and inhibitors of the recombinant enzyme. The xyloside that showed the highest catalytic efficiency was the xylopyranosyl-serine derivative **13**. This result was not surprising since **13** was designed to mimic the natural acceptor of the enzyme, that is, a xylose bound to a serine of the protein core. Thus, the  $k_{\text{cat}}/K_M$  value for **13** was more than 5-folds higher than the  $k_{\text{cat}}/K_M$  for xyloside **14**, which showed the lowest value. Interestingly, the *S*-glycoside **7**, in which a sulfur atom has replaced the glycosidic oxygen atom, was a good

substrate for the recombinant enzyme with a  $k_{\text{cat}}/K_M$  of  $118.1 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ . This result is in agreement with earlier observations by Sobue *et al.* on the ability of phenyl  $\beta$ -D-thioxylopyranoside (**7**) to prime the synthesis of chondroitin sulfate chains.<sup>25</sup> *S*-Glycosides are interesting compounds since they are more stable against enzymatic cleavage than their *O*-glycoside counterparts<sup>26</sup> and, therefore, their bioavailability must be also higher.

### Study of the antiproliferative activity of the xylopyranoside derivatives

To test if there is a relationship between the catalytic efficiency of the recombinant  $\beta$ -1,4-GalT 7 with the different xylopyranosides and their antiproliferative activity, we assayed selected xylosides against the human lung carcinoma cell line A 549. Xyloside **7** was chosen for its characteristic *S*-glycoside group, aliphatic xylosides **8** and **9** were selected as representatives of amide containing compounds, and, finally, the high  $k_{\text{cat}}/K_M$  value calculated for xyloside **13** prompted us to also test it. Xyloside **14** was included in the study as a positive control since its antiproliferative activity against this cell line has been already demonstrated.<sup>8a</sup> Methyl D-xylopyranoside **4** was used as negative control since this compound was not the substrate for the recombinant enzyme (Table 2). Finally, the peracetylated derivatives of **4** (compound **25**) and **13** (compound **24**) were also included in the study since it has been described that peracetylated glycosides can penetrate more efficiently into the cells and once inside they can be deacetylated by endogenous carboxylesterases leading to the bioactive compound.<sup>5</sup>

As expected, xylosides **4** and its peracetylated derivative **25** were unable to inhibit the cell proliferation (Fig. 6 and Table S1 (ESI<sup>†</sup>)). This lack of antiproliferative activity may be related to the inefficacy of **4** to be a substrate of the human  $\beta$ -1,4-GalT 7 and therefore to prime the synthesis of GAG.



**Fig. 6** Effect of xylopyranoside derivatives **7** (●), **13** (■), **14** (○) and peracetate **24** (□) on the proliferation of human lung carcinoma cells A549. Values correspond to the mean of 3 different experiments performed in triplicate. For the sake of clarity only results from 4 compounds are shown. See Table S1 (ESI<sup>†</sup>) for antiproliferative values of xylosides **4**, **8**, **9**, and peracetate **25** (mean  $\pm$  SD).

The only other tested xyloside that did not present antiproliferative activity was the *S*-glycoside **7**. This result is in agreement with Mani's findings which showed that 2-naphthyl *S*- $\beta$ -D-xylopyranoside was also unable to inhibit the growth of lung fibroblasts, lung carcinoma cells, or transformed endothelial cells.<sup>8a</sup> The rest of xylopyranosides tested showed IC<sub>50</sub> values than 2-(6-hydroxynaphthyl)  $\beta$ -D-xylopyranoside (**14**). The xyloside that showed the lowest IC<sub>50</sub> (54  $\mu$ M) was the peracetate **24**. This value was lower than the IC<sub>50</sub> calculated for deacetylated **13** (88  $\mu$ M) and this difference may be explained because of a higher uptake of the peracetylated compound by the cell. Compounds **8** showed an IC<sub>50</sub> of 68  $\mu$ M, substantially lower than the IC<sub>50</sub> showed by xyloside **9**, in which the only difference is that the alkyl chain is four carbons longer. Finally, it is interesting to note that all the xylopyranosides that showed antiproliferative activity were cytotoxic at high concentrations. Xylosides **8** and **13** and peracetate **24** were cytotoxic at concentrations higher than 100  $\mu$ M, xylosides **9** and **14** exhibited cytotoxic effect at concentrations higher than 150 and 250  $\mu$ M, respectively, whereas xylosides **4**, **7** and peracetate **25** were not cytotoxic (Table S1, ESI<sup>†</sup>).

## Experimental

### Materials and general procedures

The clone IRAUp969H0626D containing the cDNA sequence of the human UDP-galactose-4-epimerase 4- $\beta$ -D-galactosyltransferase was purchased from imaGenes. The *E. coli* strain BL21(DE3) (Stratagene) was used as expression hosts and *E. coli* DH5 $\alpha$  (Promega) served as a host for plasmid maintenance. Restriction enzymes and T4-DNA ligase were purchased from MBI Fermentas AB and the pET-28b(+) expression vector was purchased from Novagen. DNase I was from Roche and lysozyme was from USB. Pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) were purchased from Sigma-Aldrich. Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was purchased from AppliChem GmbH. A plasmid purification kit was from Sigma and DNA purification kit from agarose gels was from Eppendorf. All other chemicals were purchased from commercial sources as reagent grade.

UV/Visible spectra were recorded on a Spectra Max Plus 384 spectrophotometer at 25 °C. HPLC analyses were carried out on a chromatograph Dionex, Dual Gradient Pump, with a detector Diodo Array UV/VIS PDA-3000 (Dionex Co.). SDS-PAGE was performed in a Mini-Protein 3 Cell Electrophoresis Unit (BioRad) using 10% and 5% acrylamide in the separating and stacking gels, respectively. Gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (AppliChem GmbH). Electrophoresis was always run under reducing conditions, in the presence of 5%  $\beta$ -mercaptoethanol. Protein and DNA gels were quantified by densitometry using a GeneGenius Gel Documentation and Analysis System (Syngene). Nickel-iminodiacetic acid (Ni<sup>2+</sup>-IDA) agarose was supplied by Agarose Bead Technologies.

Optical rotations were determined on a Perkin Elmer 241 Polarimeter ( $\lambda$  = 589 nm, 1 dm cell). <sup>1</sup>H NMR spectra were registered at 500, 400 or 300 MHz, and <sup>13</sup>C NMR were

obtained at 125 or 100 MHz using CDCl<sub>3</sub> or CD<sub>3</sub>OD as a solvent at room temperature. Chemical shift values are reported in parts per million ( $\delta$ ). Coupling constant values (*J*) are reported in hertz (Hz), and spin multiplicities are indicated by the following symbol: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet). Mass spectroscopy spectra were registered on a hp series 1100 MSD spectrometer.

### Peptide mass fingerprint analysis

Peptide mass fingerprint analysis from the SDS-PAGE band corresponding to the recombinant  $\beta$ -1,4-GalT **7** was performed at the Proteomic Unit of the Spanish National Center of Biotechnology (CNB-CSIC). Samples were digested with sequencing grade trypsin O/N at 37 °C. The analysis by MALDI-TOF mass spectrometry produces peptide mass fingerprints and the peptides observed can be collated and represented as a list of monoisotopic molecular weights. Data were collected in the *m/z* range of 800–3600.

### Synthesis of xylopyranose derivatives

**2-Cyanoethyl  $\beta$ -D-2,3,4-tri-*O*-acetyl-xylopyranoside (**16**).** To a solution of tetra-*O*-acetyl-xylopyranose (**15**, 5.0 g, 15.7 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (125 mL), 3-hydroxypropionitrile (1.3 mL, 18.8 mmol, 1.2 eq.) and BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (1.86 mL, 15.7 mmol, 1 eq.) were added. The mixture was stirred for 1 h at room temperature under an argon atmosphere, then diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) and washed with NaHCO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O. The organic layer was concentrated *in vacuo* and the resulting residue was crystallized from methanol to give **16** (4.3 g, 82%) as a solid. Mp: 161–165 °C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: –57.1 (*c* 1.49, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5.17 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz), 4.98–4.88 (m, 2H), 4.56 (d, *J* = 6, 6 Hz), 4.15 (dd, *J* = 4.8, 12.0 Hz), 4.00 (dt, 1H, *J* = 5.7, 9.9 Hz), 3.72 (dt, *J* = 6.3, 9.9 Hz), 3.40 (dd, 1H, *J* = 8.4, 12.0 Hz), 2.63 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (133 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.0, 169.8, 169.6, 117.2, 100.75, 70.8, 70.0, 68.5, 63.8, 61.9, 20.7, 19.0. Anal. calc. for C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>8</sub>: C 51.06, H 5.82, N 4.25. Found: C 50.86, H 5.78, N 4.16%.

**3-Acetamido-propyl  $\beta$ -D-xylopyranoside (**8**).** **16** (100 mg, 0.3 mmol) was dissolved in a EtOAc–MeOH solution (2 : 1, v/v, 9 mL) and Pd/C (50 mg) and trifluoroacetic acid (34 mL, 1.5 eq.) were added. The mixture was stirred for 18 h at room temperature under an H<sub>2</sub> atmosphere. After this time, the reaction mixture was filtered through Celite<sup>®</sup> and the solids were washed with a EtOAc–MeOH solution (2 : 1, v/v). The combined filtrate and washing were concentrated to give amine **17**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5.23 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz), 4.98–4.82 (m, 2H), 4.61 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 4.08 (dd, 1H, *J* = 5.5, 11.7 Hz), 3.94 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 3.47 (dd, 1H, *J* = 9.7, 11.7 Hz), 3.02 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.98–1.88 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  171.5, 102.1, 73.2, 72.7, 70.4, 68.0, 63.3, 38.9, 28.6, 20.5.

**17** (137 mg, 0.3 mmol) was dissolved in dry pyridine (2 mL) and acetic anhydride (2 mL) was added. The mixture was stirred for 18 h at room temperature, then concentrated and the residue was purified by column chromatography (EtOAc–MeOH, 20 : 0  $\rightarrow$  20 : 1) to give **18** (130 mg, 100%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 5.25 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz), 5.05–4.79 (m, 2H), 4.60 (d, *J* = 7.3 Hz), 4.10 (dd, 1H, *J* = 5.1, 11.7 Hz), 3.88 (m, 1H), 3.66–3.39 (m, 2H), 3.31–3.19 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.88–1.70 (m, 2H).

**18** (100 mg, 0.27 mmol) was dissolved in methanol (15 mL) and treated with 0.5 M NaOMe (5 mL) for 1 h at room temperature, then neutralized with Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) resin, and filtered. The solvent was evaporated to give **8** (67.3 mg, 98%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: –41.6 (*c* 1.25, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 4.20 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 3.92–3.82 (m, 2H), 3.57 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.36–3.12 (m, 5H), 1.92 (s, 3H), 1.78 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 172.1, 103.9, 76.3, 73.7, 70.0, 67.2, 65.8, 36.6, 29.1, 21.4. MS (ES) *m/z* (calc. 249.1): 250.1 (*M* + 1), 272.0 (*M* + 23). Anal. calc. for C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>: C 48.19, H 7.68, N 5.62. Found: C 47.99, H 7.88, N 5.57%.

**3-Hexanamido-propyl β-D-xylopyranoside (9).** Amine **17** (274 mg, 0.6 mmol), obtained as described above, was dissolved in dry pyridine (2 mL) and hexanoic anhydride (278 μL, 2 eq.) was added. The reaction was stirred for 3 h at room temperature, then concentrated and the residue was purified by column chromatography (hexane–EtOAc 1 : 1) to give **19** (129 mg, 50%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.95 (s, 1H), 2.15 (t, *J* = 9.0 Hz), 5.02–4.82 (m, 2H), 4.42 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.10 (dd, 1H, *J* = 5.4, 11.7 Hz), 3.89 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 3.45–3.18 (m, 3H), 2.15 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 6H), 1.82–1.68 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.37–1.21 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 6.6 Hz).

**19** (100 mg, 0.23 mmol) was deacetylated under similar conditions as described for **18** to give **9** (64.2 mg, 91%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: –40.4 (*c* 1.53, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 4.19 (d, *J* = 7.6 Hz), 3.91–3.81 (m, 2H), 3.56 (m, 1H), 3.36–3.12 (m, 5H), 2.16 (t, *J* = 7.2 Hz), 1.78 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.40–1.24 (m, 4H), 0.91 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 175.5, 103.9, 76.7, 73.7, 70.0, 67.2, 65.8, 36.4, 36.0, 31.3, 29.1, 25.6, 22.3, 13.1. Anal. calc. for C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>: C 55.06, H 8.91, N 4.59. Found: C 54.78, H 9.06, N 4.52%.

**Sodium *N*-(*O*-(β-D-xylopyranosyl)-3-hydroxypropyl)-succinamate (10).** Amine **17** (274 mg, 0.61 mmol), obtained as described above, was dissolved in dry pyridine (2 mL) and succinic anhydride (60 mg, 2 eq.) was added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature, then concentrated and the residue purified by column chromatography (AcOEt–MeOH, 10 : 0 → 10 : 1) to give **20** (387 mg, 75%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.49 (s, 1H), 5.21 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz), 5.02–4.86 (m, 2H), 4.42 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 4.11 (dd, 1H, *J* = 5.1, 12.0 Hz), 3.91 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 3.42–3.26 (m, 3H), 2.66 (m, 2H), 2.56 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 6H), 1.78 (m, 2H).

**20** (160 mg, 0.19 mmol) was deacetylated under similar conditions as described for **18** to give **10** (62 mg, 98%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: –31.9 (*c* 1.65, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 4.20 (d, *J* = 7.8 Hz), 3.92–3.82 (m, 2H), 3.57 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.37–3.14 (m, 5H), 2.63–2.55 (m, 3H), 2.51–2.43 (m, 2H), 1.78 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ 175.1, 173.4, 103.8, 76.6, 73.7, 70.0, 67.2, 65.7, 36.5, 30.4, 29.1, 28.6. Anal. calc. for C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>NNaO<sub>8</sub>: C 43.77, H 6.12, N 4.25, Na 6.98. Found: C 43.08, H 6.12, N 3.90%.

**3-Benzamido-propyl β-D-xylopyranoside (11).** Amine **17** (274 mg, 0.6 mmol), obtained as described above, was dissolved in dry pyridine (2 mL) and benzoyl chloride (215 μL, 3 eq.) was added. The mixture was stirred for 18 h at room temperature, then washed with AcOEt and concentrated. The residue was purified by column chromatography (hexane–AcOEt 3 : 1 → 1 : 1) to give **21** (54 mg, 20%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.77 (m, 2H), 7.53–7.38 (m, 3H), 6.69 (s, 1H), 5.18 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz), 5.01–4.84 (m, 2H), 4.48 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 4.08 (dd, 1H, *J* = 6.6, 5.1 Hz), 3.93 (m, 1H), 3.71–3.39 (m, 3H), 3.34 (dd, 1H, *J* 9.3, 2.4 Hz), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.89 (m, 2H).

**21** (54 mg, 0.12 mmol) was deacetylated under similar conditions as described for **18** to give **11** (37 mg, 99%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: –34.4 (*c* 1.42, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.82–7.78 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.45 (m, 2H), 4.22 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 3.92 (m, 1H), 3.85 (dd, 1H, *J* = 5.5, 12.3 Hz), 3.64 (m, 1H), 3.57–3.42 (m, 3H), 3.31 (m, 1H), 3.24–3.15 (m, 2H), 1.91 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 169.0, 134.6, 131.4, 128.4, 127.0, 104.0, 76.7, 73.8, 70.0, 67.4, 65.8, 37.1, 29.2. Anal. calc. for C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>: C 57.87, H 6.80, N 4.50. Found: C 57.58, H 6.78, N 4.76%.

**Sodium *N*-(*O*-(β-D-xylopyranosyl)-3-hydroxypropyl)-phthalamate (12).** Amine **17** (274 mg, 0.6 mmol), obtained as described above, was dissolved in dry pyridine (2 mL) and phthalic anhydride (221 mg, 2 eq.) was added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature, then concentrated and the residue was purified by column chromatography (AcOEt–MeOH 10 : 0 → 10 : 1) to give **22** (360 mg, 80%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.14 (t, 1H, *J* = 8.8 Hz), 4.95–5.75 (m, 2H), 4.43 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz), 4.02 (dd, 1H, *J* = 5.4 Hz, *J* = 11.7 Hz), 3.95–3.83 (m, 3H), 3.67–3.38 (m, 3H), 3.30 (dd, 1H, *J* = 9.5, 11.7 Hz), 2.01 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.87 (m, 2H).

**22** (280 mg, 0.64 mmol) was deacetylated under similar conditions as described for **18** to give **12** (229 mg, 95%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: –24.3 (*c* 1.50, H<sub>2</sub>O) <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.96 (m, 1H), 7.68–7.48 (m, 2H), 7.43 (m, 1H), 4.23 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 3.94 (m, 1H), 3.83 (dd, 1H, *J* = 5.4, 11.5 Hz), 3.67 (m, 1H), 3.52–3.12 (m, 11H), 1.98–1.84 (m, 2H). Anal. calc. for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>NNaO<sub>8</sub>: C 50.93, H 5.34, N 3.71, Na 6.09. Found: C 51.03, H 5.61, N 3.54%.

**O<sub>γ</sub>-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-D-xylopyranosyl)-*N*-Cbz-L-serine-methyl-ester (24).** *N*-Cbz-L-serine methyl-ester (**23**, 200 mg, 0.79 mmol) and tetra-*O*-acetyl-β-D-xylopyranose (**15**, 500 mg, 2 eq.) were dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL), then molecular sieve (4 Å, 4.5 g) and TMSOTf (78 μL, 0.5 eq.) were added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature under an argon atmosphere. The reaction mixture was further diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) and neutralized with triethylamine. Evaporation of the solvent and purification by column chromatography (hexane–AcOEt 3 : 1 → 1 : 1) gave a residue fraction (340 mg) which was further purified by column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–AcOEt 9 : 1) to give **24** as a solid



(303 mg, 75%). Mp: 102–104 °C.  $[\alpha]_D^{25}$ : –29.4 (*c* 1.03, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.42–7.23 (m, 5H), 5.56 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 5.12 (s, 2H), 5.09 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 4.90–4.81 (m, 2H), 4.51 (m, 1H), 4.48 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz), 4.22 (dd, 1H, *J* = 2.7, 10.1 Hz), 4.03 (dd, 1H, *J* = 4.7, 12.1 Hz), 3.79 (dd, 1H, *J* = 3.1, 10.1 Hz), 3.76 (s, 3H), 3.34 (dd, 1H, *J* = 7.8, 12.1 Hz), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.3, 170.2, 170.1, 169.6, 156.1, 136.3, 128.8, 128.5, 128.4, 100.7, 70.7, 70.2, 69.2, 68.6, 67.4, 61.7, 54.4, 53.0, 21.0, 20.9, 20.8. MS (ES) *m/z* (calc. 511.2): 534.2 (*M* + 23). Anal. calc. for C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>12</sub>: C 54.01, H 5.71, N 2.74. Found: C 53.88, H 5.71, N 2.74%.

**O-β-D-Xylopyranosyl-N-Cbz-L-serine-methyl-ester (13).** To a mixture of KCN (6.5 mg, 0.09 mmol) and MeOH (10 mL) was added **24** (100 mg, 0.19 mmol). The mixture was stirred at room temperature until complete conversion into deacetylated xylopyranoside **13** (1 h), as indicated by TLC (AcOEt–MeOH 25 : 1, v/v). After this time an equimolar quantity of mixed Dowex® 50X4 (Na<sup>+</sup>) and Dowex® 1X8 (HCO<sub>3</sub><sup>–</sup>) resins were added, then the mixture was filtered and concentrated. The colorless residue was purified by column chromatography (AcOEt–MeOH 25 : 0 → 25 : 1) to give **13** (49.8 mg, 70%) as a solid. Mp: 42–46 °C.  $[\alpha]_D^{25}$ : –23.4 (*c* 1.13, MeOH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.40–7.23 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.44 (m, 1H), 4.26 (dd, 1H, *J* = 3.7 Hz, *J* = 10.1 Hz), 4.16 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 3.81 (dd, 1H, *J* = 5.3 Hz, *J* = 11.3 Hz), 3.74–3.67 (m, 4H), 3.43 (m, 1H), 3.27 (t, 1H, *J* = 8.8 Hz), 3.19–3.09 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 172.2, 158.7, 138.1, 129.47, 129.0, 128.9, 105.1, 77.6, 74.8, 71.0, 70.5, 67.8, 67.0, 55.7, 53.0. Anal. calc. for C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub>: C 52.98, H 6.02, N 3.63. Found: C 53.03, H 5.96, N 3.56%.

### Enzyme activity assays

Galactosyltransferase activity of the recombinant β-1,4-GalT 7 was determined following the method previously described by Higuchi *et al.* with minor modifications.<sup>27</sup> Formation of disaccharide **2** was followed by HPLC with A<sub>300nm</sub> monitoring in reaction mixtures of 1 ml containing sodium acetate buffer (25 mM, pH 5.0), MnCl<sub>2</sub> (20 mM), KCl (50 mM), UDP-Gal (50 μM), and **1** (0.5 mM). Aliquots were taken each 5 min and analyzed by HPLC using a Lichrosorb RP18 column. The mobile phase employed was TFA (0.1% in H<sub>2</sub>O)–CH<sub>3</sub>CN 17 : 3 (v : v) and the chromatography was run under isocratic conditions at 1 ml min<sup>–1</sup> flow rate. Measurements of kinetic parameters for UDP-Gal were performed with 11–14 μg of purified protein at fifteen different UDP-Gal concentrations in the range 0.025–20 mM and with a fixed concentration of **1** of 10 mM. Assays to determine the kinetic parameters for *p*-Nph-β-D-Xyl **1** were performed with 7–8 μg of purified β-1,4-GalT 7 at 10 concentrations of the substrate (0.01–10 mM) under saturating concentrations of UDP-Gal (0.6 mM).

Activity of the recombinant β-1,4-GalT 7 with xylopyranosides derivatives **11** and **14** and their kinetic parameters were determined by HPLC as described previously. Activity with compounds **5–10**, **12** and **13** was measured spectrophotometrically in a coupled enzymatic assay, where the decrease of NADH absorbance at 340 nm is directly proportional to the

release of UDP during the galactosyltransferase-catalyzed reaction.<sup>28</sup> In these cases, activity assays were run at 25 °C following the decrease of absorbance at 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) for 30 minutes in a 1 mL reaction mixture containing sodium acetate buffer (25 mM, pH 5.0), NADH (0.2 mM), PEP (0.7 mM), KCl (50 mM), MnCl<sub>2</sub> (20 mM), PK (6 U) and LDH (6 U). Substrate concentrations were varied between 0.01 and 10 mM. Activity with *p*-NO<sub>2</sub>Ph-β-D-Xyl (**1**) was also measured by this method and the obtained results were consistent with those obtained by HPLC.

Inhibition of galactosyltransferase activity by the different xylopyranoside derivatives was analyzed in a 1 mL reaction mixture containing sodium acetate buffer (25 mM, pH 5.0), KCl (50 mM), MnCl<sub>2</sub> (20 mM), UDP-gal (50 mM), **1** (10 mM) and increasing concentrations of inhibitor. Accumulation of disaccharides was monitored by HPLC as described above.

### Analysis of kinetic data

Kinetic constants were obtained using the built-in nonlinear regression tools in SigmaPlot 8.0. For the determination of apparent kinetic constants (variation of only one substrate), initial velocities (*V<sub>i</sub>*) were fitted to the Michaelis–Menten equation (eqn (1)):

$$V_i = \frac{V_{\text{max}}^{\text{app}} \cdot [S]}{K_{\text{M,S}}^{\text{app}} + [S]} \quad (1)$$

Due to substrate inhibition, the apparent kinetic constants for UDP-Gal and xylopyranoside **14** were determined using the Michaelis–Menten equation for a mechanism that involves substrate inhibition (eqn (2)):

$$V_i = \frac{V_{\text{max}}^{\text{app}} \cdot [S]}{K_{\text{M,S}}^{\text{app}} + [S] + \frac{[S]^2}{K_{\text{IS,S}}^{\text{app}}}} \quad (2)$$

where  $K_{\text{IS}}^{\text{app}}$  is the excess substrate apparent inhibition constant.

IC<sub>50</sub> for the different xylopyranosides was calculated from the four-parameter logistic regression model, which assumes symmetry around the inflection point of the standard curve. To calculate *k<sub>i</sub>* for **14**, data were fitted to eqn (3) that describe the competitive inhibition:

$$V_i = \frac{V_{\text{max}}^{\text{app}} \cdot [S]}{K_{\text{M,S}}^{\text{app}}(1 + [I]/k_{\text{ic}}^{\text{app}}) + [S]} \quad (3)$$

where *[I]* denoted concentration of inhibitor and *k<sub>ic</sub>* the competitive inhibition.

### Antiproliferative activity studies

For the determination of the antiproliferative activity, A549 cells were seeded at 3000 cells per well in 96-well plates in media containing 10% of fetal bovine serum (FBS). After 4 h of plating, the cells were serum-starved for 24 h. Cells were then allowed to proliferate in media without FBS, containing 25 ng ml<sup>–1</sup> of epidermal growth factor (EGF), in the presence of different concentrations of xylosides (330, 220, 147, 98, 65, 43, 29, 19 μM). Four days later, the number of viable cells was determined with the MTT test.<sup>29</sup>

## Conclusions

In conclusion, we have shown that it is possible to heterologously express the catalytic domain of the human  $\beta$ -1,4-GalT 7, soluble and stable enough to undertake *in vitro* studies with it. This achievement opens the possibility of developing an easy-to-use method to test the activity as decoy acceptors of natural and synthetic xylopyranosides. Since priming the synthesis of GAG is required but not enough for the antiproliferative activity of the xylosides,<sup>10a,b</sup> it is not possible to establish a direct correlation between the kinetic parameters of the recombinant  $\beta$ -1,4-GalT 7 and the antiproliferative activity of the different xylopyranosides tested. On the other hand, preliminary results obtained in A549 cell line suggest that xylopyranosides **8**, **9**, **13** and **14** exhibit a promising antiproliferative activity.

## Acknowledgements

E. G-J. and A. F-M. thank the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Grants CTQ2007-67403/BQU and CTQ2010-15418) and Comunidad de Madrid (Grant S2009/PPQ-1752) for financial support. J. C. has been supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant SAF2008-00706) and Generalitat de Catalunya (Grant 2009SGR-1072). J.F. G-G. was supported by a predoctoral I3P fellowship of the European Social Fund. We thank Mrs Eva Dalmau for excellent technical assistance.

## Notes and references

- For some reviews see: R. L. Jackson, S. J. Busch and A. D. Cardin, *Physiol. Rev.*, 1991, **71**, 481–539; B. Casu and U. Lindahl, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2001, **57**, 159–206; R. Sasisekharan, Z. Shriver, G. Venkataraman and U. Narayanasami, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**, 521–528; U. Häcker, K. Nybakken and N. Perrimon, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, **6**, 530–541; J. R. Bishop, M. Schuksz and J. D. Esko, *Nature*, 2007, **446**, 1030–1037; N. S. Gandhi and R. L. Mancera, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2008, **72**, 455–482 and references therein.
- N. B. Schwartz, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 1995, **7**, 429–445; J. D. Esko and S. B. Selleck, *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, **71**, 435–471; J. M. Whitelock and R. V. Iozzo, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2745–2764.
- (a) M. Okayama, K. Kimata and S. Suzuki, *J. Biochem.*, 1973, **74**, 1069–1073; (b) N. B. Schwartz, L. Galligani, P. L. Ho and A. Dorfman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1974, **71**, 4047–4051; (c) H. C. Robinson, M. J. Brett, P. J. Tralaggan, D. A. Lowther and M. Okayama, *Biochem. J.*, 1975, **148**, 25–34.
- S.-F. Kuan, C. J. Byrd, C. B. Baum and Y. S. Kim, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 19271–19277.
- A. K. Sarkar, T. A. Fritz, W. H. Taylor and J. D. Esko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 3323–3327; A. K. Sarkar, K. S. Rostand, R. K. Jain, K. L. Matta and J. D. Esko, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 25608–25616; A. K. Sarkar, J. R. Brown and J. D. Esko, *Carbohydr. Res.*, 2000, **329**, 287–300; T. K.-K. Mong, L. V. Lee, J. R. Brown, J. D. Esko and C.-H. Wong, *ChemBioChem*, 2003, **4**, 835–840.
- M. Latorre, P. Peñalver, J. Revuelta, J. L. Asensio, E. García-Junceda and A. Bastida, *Chem. Commun.*, 2007, 2829–2831.
- (a) F. N. Lugemwa and J. D. Esko, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 6674–6677; (b) T. A. Fritz, F. N. Lugemwa, A. K. Sarkar and J. D. Esko, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 300–307; (c) F. N. Lugemwa, A. K. Sarkar and J. D. Esko, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 19159–19165; (d) B. Kuberan, M. Ethirajan, X. V. Victor, V. T. K. Nguyen and A. Do, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 198–200.
- (a) K. Mani, B. Havsmark, S. Persson, Y. Kaneda, H. Yamamoto, K. Sakurai, S. Ashikari, H. Habuchi, S. Suzuki, K. Kimata, A. Malmström, G. Westergren-Thorsson and L.-Å. Fransson, *Cancer Res.*, 1998, **58**, 1099–1104; (b) K. Mani, M. Belting, U. Ellervik, N. Falk, G. Svensson, S. Sandgren, F. Cheng and L.-Å. Fransson, *Glycobiology*, 2004, **14**, 387–397.
- M. Belting, L. Borsig, M. M. Fuster, J. R. Brown, L. Persson, L.-Å. Fransson and J. D. Esko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 371–376.
- (a) M. Jacobsson, U. Ellervik, M. Belting and K. Mani, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 1932–1938; (b) R. Johnsson, K. Mani and U. Ellervik, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 2868–2877; (c) F. Cheng, R. Johnsson, J. Nilsson, L.-Å. Fransson, U. Ellervik and K. Mani, *Cancer Lett.*, 2009, **273**, 148–154.
- R. Almeida, S. B. Levery, U. Mandel, H. Kresse, T. Schwientek, E. P. Bennett and H. Clausen, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 26165–26171.
- T. Okajima, K. Yoshida, T. Kondo and K. Furukawa, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 22915–22918.
- J. C. Paulson and K. J. Colley, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 17615–17618; K. J. Colley, *Glycobiology*, 1997, **7**, 1–13.
- A quite completed guide to select a method to produce recombinant proteins can be found in: S. Gräslund, P. Nordlund and J. Weigelt, *et al.*, *Nat. Methods*, 2008, **5**, 135–146.
- G. Hannig and S. C. Makrides, *Trends Biotechnol.*, 1998, **16**, 54–60; F. Baneyx, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, **10**, 411–421; W. Peti and R. Page, *Protein Expression Purif.*, 2007, **51**, 1–10; S. Zerbs, A. M. Frank and F. R. Collart, *Methods Enzymol.*, 2009, **463**, 149–168.
- F. Baneyx, in *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, ed. in chief A. L. Demain and J. E. Davies, ed. G. Cohen, C. L. Hershberger, L. J. Forney, I. B. Holland, W.-S. Hu, J.-H. D. Wu, D. H. Sherman and R. C. Wilson, American Society of Microbiology, Washington D.C., 2nd edn., 1999, pp. 551–565; A. Bastida, A. Fernández-Mayoralas, R. G. Arrayás, F. Iradier, J. C. Carretero and E. García-Junceda, *Chem.-Eur. J.*, 2001, **7**, 2390–2397; A. Vera, N. Gonzalez-Montalban, A. Aris and A. Villaverde, *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, **96**, 1101–1106; S. Sahdev, S. K. Khattar and K. S. Saini, *Mol. Cell. Biochem.*, 2008, **307**, 249–264; W. H. Brondyk, *Methods Enzymol.*, 2009, **463**, 131–147.
- A. Mogk, M. P. Mayer and E. Deuring, *ChemBioChem*, 2002, **3**, 807–814; A. Bastida, M. Latorre and E. García-Junceda, *ChemBioChem*, 2003, **4**, 531–533; M. Martínez-Alonso, A. Vera and A. Villaverde, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, **273**, 187–195.
- D. Esposito and D. K. Chatterjee, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006, **17**, 353–358.
- F. Daligault, S. Rahuel-Clermont, S. Gulberti, M.-T. Cung, G. Branlant, P. Netter, J. Magdalou and V. Lattard, *Biochem. J.*, 2009, **418**, 605–614.
- M. Pasek, E. Boeggeman, B. Ramakrishnan and P. K. Qasba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **394**, 679–684.
- D. Aoki, H. E. Appert, D. Johnson, S. S. Wong and M. N. Fukuda, *EMBO J.*, 1990, **9**, 3171–3178; P. Wang, G.-J. Shen, Y.-F. Wang, Y. Ichikawa and C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3985–3990; A. Bastida, A. Fernández-Mayoralas and E. García-Junceda, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, **10**, 737–742; J. Egelund, B. L. Petersen, J. S. Motawia, I. Damager, A. Faik, H. Clausen, C. E. Olsen, T. Ishii, P. Ulvskov and N. Geshi, *Plant Cell*, 2006, **18**, 2593–2607; A. M. Swistowska, S. Wittrock, W. Collisi and B. Hofer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **79**, 255–261.
- E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch, in *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. J. M. Walker, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005, pp. 571–607.
- Essentials of Glycobiology*, ed. A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart and J. Marth, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999, pp. 151–152; J. M. Whitelock and R. V. Iozzo, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2745–2764.
- R. López and A. Fernández-Mayoralas, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 737–745.
- M. Sobue, H. Habuchi, K. Ito, H. Yonekura, K. Oguri, K. Sakurai, S. Kamohara, Y. Ueno, R. Noyori and S. Suzuki, *Biochem. J.*, 1987, **241**, 591–601.

- 
- 26 H. Driguez, *Top. Curr. Chem.*, 1997, **187**, 85–116; Z. J. Witczak and J. M. Culhane, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **69**, 237–244.
- 27 T. Higuchi, S. Tamura, K. Takagaki, T. Nakamura, A. Morikawa, K. Tanaka, A. Tanaka, Y. Saito and M. Endo, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1994, **29**, 135–142.
- 28 S. Gosselin, M. Alhussaini, M. B. Streiff, K. Takabayashi and M. M. Palcic, *Anal. Biochem.*, 1994, **220**, 92–97; D. K. Fitzgerald, B. Colvin, R. Mawal and K. E. Ebner, *Anal. Biochem.*, 1970, **36**, 43–61.
- 29 T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55–63.
- 30 C. Bui, I. Talhaoui, M. Chabel, G. Mulliert, M. W. H. Coughtrie, M. Ouzzine and S. Fournel-Gigleux, *FEBS Lett.*, 2010, **584**, 3962–3968; I. Talhaoui, C. Buil, R. Oriol, G. Mulliert, S. Gulberti, P. Netter, M. W. H. Coughtrie, M. Ouzzine and S. Fournel-Gigleux, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 37342–37358.